

Chemische und biochemische Synthesen zur Funktionsuntersuchung von Membranproteinen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Ellen Mak

Kiel 2014

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. Eric Beitz
Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Bernd Clement
Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2014
Zum Druck genehmigt: 26.03.2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Proteinbiosynthese	2
1.1.1 Die tRNA	2
1.2 Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine	3
1.2.1 <i>Nonsense</i> -Suppression-Methode	4
1.2.2 Synthese der misacylierten transfer-RNA	5
1.2.3 Translationsysteme	8
1.3 Zellfreie Proteinsynthese	9
1.3.1 Zusatz von Detergenzien zur Herstellung von Membranproteinen	11
1.3.2 Amphipole	12
1.4 <i>Trypanosoma brucei</i>	13
1.4.1 Kreuzresistenzen gegenüber Melarsoprol und Pentamidin . . .	14
1.4.2 Aquaglyceroporine aus Trypanosomen	15
1.4.3 Aquaglyceroporin 2 aus <i>Trypanosoma brucei</i> - Pentamidinauf-	
nahme?	16
2 Zielsetzung der Arbeit	17
3 Synthesen und Ergebnisse	19
3.1 Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine	19
3.1.1 Synthese des Dinukleotids	20
3.1.2 Aktivieren und Schützen der unnatürlichen Aminosäure	27
3.1.3 HPLC Analytik	28
3.1.4 Synthese der verkürzten tRNA	30
3.2 Zellfreie Synthese mit Amphipolen	34

3.2.1	Untersuchungen von Amphipolen in der analytischen zellfreien Synthese	35
3.2.2	Analytische zellfreie Synthese von unterschiedlichen Kanalpro- teinen in PMAL-C8	39
3.2.3	Präparative zellfreie Synthese von M2-Kanal mit PMAL-C8	41
3.2.4	Funktionstestung des in PMAL-C8 hergestellten M2-Kanals am SURFE ² R	45
3.3	Untersuchungen zur Pentamidinaufnahme in <i>Trypanosoma brucei</i>	46
3.3.1	Voruntersuchungen zur <i>TbAQP2</i>	47
3.3.2	Synthese von Pentamidin-Analoga	48
3.3.3	Hemmung der Glycerolleitfähigkeit von <i>TbAQP2</i> durch die Pentamidin-Analoga	51
3.3.4	Synthese von fluoreszierenden Pentamidin-Analoga	52
3.3.5	Synthese von Cumarin-Pentamidin-Analoga	54
3.3.6	Synthese von Fluorescein-Pentamidin-Analoga	64
4	Diskussion und Ausblick	69
4.1	Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine	69
4.1.1	Synthese des Dinukleotids und der unnatürlichen Aminosäure	69
4.1.2	Synthese der verkürzten tRNA	73
4.1.3	Ausblick	74
4.2	Zellfreie Synthese mit Amphipolen	75
4.2.1	Untersuchungen von Amphipolen in der analytischen zellfreien Proteinsynthese	75
4.2.2	Analytische zellfreie Synthese von unterschiedlichen Kanalpro- teinen mit PMAL-C8	76
4.2.3	Präparative zellfreie Synthese	78
4.2.4	Funktionstestung des in PMAL-C8 hergestellten M2-Kanals am SURFE ² R	79
4.2.5	Ausblick	80
4.3	Untersuchung der Pentamidinaufnahme in <i>Trypanosoma brucei</i>	81
4.3.1	Mechanismus der Pentamidinaufnahme	84
4.3.2	Ausblick	89
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	93

7	Material und Methoden	95
7.1	Molekularbiologische und proteinchemische Arbeiten	95
7.1.1	Material und Enzyme	95
7.1.2	Geräte	98
7.1.3	Plasmide	99
7.1.4	DNA-Sequenzen	100
7.1.5	Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	100
7.1.6	<i>E. coli</i> Stämme	101
7.1.7	Antikörper	101
7.1.8	Puffer, Medien und Lösungen	102
7.1.9	Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren	105
7.1.10	Arbeiten mit RNA - tRNA Synthese	108
7.1.11	Zellfreie Proteinsynthese	111
7.1.12	Proteinchemie	117
7.1.13	Fluoreszenzmessungen zur Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen	120
7.1.14	Rekonstitution von Proteinen in Liposomen	120
7.2	Chemische Synthesen	122
7.2.1	Chemikalien	122
7.2.2	Geräte	123
7.2.3	Lösungsmittel	125
7.2.4	Absorbenzien für Chromatographie und Filtration, Trocken- mittel	125
7.3	Synthesen	126
7.3.1	Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine	126
7.3.2	Synthese der Pentamidin-Analoga	136
	Literaturverzeichnis	155

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Phosphor-Triester-Methode	6
1.2	Schematische Darstellung zum Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine	7
1.3	Struktur von pCpA und pdCpA	8
1.4	Schematische Darstellung des <i>Continuous Exchange Cell Free</i> -Verfahrens.	10
1.5	Strukturen der Chemotherapeutika	13
1.6	Aufbau von Aquaglyceroporinen	16
3.1	ESI-Massenspektrum vom Dinukleotid	25
3.2	Vergleich der ¹ H-NMR-Spektren von Dinukleotid	25
3.3	Vergleich der ³¹ P-NMR-Spektren vom Dinukleotid mit den Edukten	26
3.4	HPLC-Chromatogramme von pdCpA	29
3.5	HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches zur Synthese des acylierten Dinukleotids	31
3.6	Darstellung der <i>run off</i> -Transkription	32
3.7	Kontrolle der vollständigen Linearisierung mittels Agarosegelelektrophorese	33
3.8	Bestimmung der Bandengröße der verkürzten tRNA(-CA).	33
3.9	Struktur der kommerziell erhältlichen Amphipole	34
3.10	Detergenzien <i>Screen</i> von GFP	36
3.11	Detergenzien <i>Screen</i> von <i>Pf</i> AQP-GFP	38
3.12	Zellfreie Synthese von unterschiedlichen Membranproteinen mit PMAL-C8	40
3.13	Schematische Darstellung der Reinigung und Rekonstitution eines zellfrei hergestellten Proteins	42
3.14	Coomassie gefärbte Gele von M2-GFP	43
3.15	Schematische Darstellung des Saccharose-Gradienten	44

3.16	Saccharose-Gradienten-Zentrifugation zum Nachweis der Bildung von Proteoliposomen	44
3.17	Saccharose-Gradienten-Zentrifugation nach dem veränderten Protokoll	46
3.18	Vergleich von Glycerol und Pentamidin	47
3.19	Glycerolleitfähigkeit von <i>TbAQP2</i> und ihr Nachweis in den Hefeprotoplasten	47
3.20	Konzentrations- und pH-abhängige Hemmung von <i>TbAQP2</i> durch Pentamidin	48
3.21	Konzentrationsabhängige Hemmung von <i>TbAQP2</i> durch die Pentamidin-Analoga 4- <i>n</i> -Propoxybenzamidin und 4- <i>n</i> -Pentoxybenzamidin	51
3.22	Zielstruktur des fluoreszierenden Pentamidin-Analogen	53
3.23	ESI-Massenspektrum von Cumarin-Pentamidin-Analoga. Entschüt- zungsversuch	64
4.1	Vergleich von <i>EcGlpF</i> und <i>TbAQP2</i>	82
7.1	Plasmid pBluescript II SK (-)	99
7.2	Plasmid pUC18	99
7.3	Plasmid pIVEX2.3wGFPc	100

Tabellenverzeichnis

3.1	ESI-Massenspektren der geschützten Kopplungsprodukte	22
3.2	IC ₅₀ -Werte der Pentamidin-Analoga 4- <i>n</i> -Propoxybenzamidin und 4- <i>n</i> -Pentoxybenzamidinen	51
3.3	Ausbeuten und veränderte Reaktionsbedingungen bei der Synthese der Nitrilverbindungen	58
3.4	Eingesetzte Reaktionsbedingungen zur Synthese von Fluorescein-Pentamidin-Analogen	66
7.1	Agarosekonzentrationen	106
7.2	PCR-Programm für die Sequenzierung	108
7.3	Pipettierschema zur Linearisierung	108
7.4	Pipettierschema zur Transkription	109
7.5	Zusammensetzung von 6 % Harnstoff-Polyacrylamidgel	110
7.6	Pipettierschema für analytischen zellfreien Ansatz	113
7.7	Pipettierschema für <i>Magnesium Screen</i>	114
7.8	Eingesetzte Detergenzien für die analytische zellfreie Proteinsynthese	114
7.9	Pipettierschema für einen präparativen zellfreien Ansatz	116
7.10	Imidazolkonzentrationen zur Elution des präparativ zellfrei hergestellten Proteins	118
7.11	Herstellung und Zusammensetzung von zwei SDS-Polyacrylamidgelen	119

Schemenverzeichnis

3.1	Struktur des Dinukleotids	19
3.2	Syntheschema von $N^6,N^6,2',3'$ -O-Tetrabenzoyladenosen	20
3.3	Struktur der eingesetzten Cytidine als Phosphoramidite.	21
3.4	Struktur der Kopplungsreagenzien.	21
3.5	Synthese von unterschiedlich geschützten Kopplungsprodukten.	22
3.6	Synthese von pdCpA	23
3.7	Schützen und Aktivieren der unnatürlichen Aminosäuren.	28
3.8	Veresterung der unnatürlichen Aminosäure mit pdCpA	30
3.9	Struktur der Pentamidin-Analoga	49
3.10	Synthese von Aluminiumreagenz	50
3.11	Synthese von Pentamidin-Analoga 4- <i>n</i> -Propoxybenzamidin und 4- <i>n</i> - Pentoxybenzamidinen	50
3.12	Struktur der Fluoreszenzfarbstoffe	53
3.13	Cumarin-Pentamidin-Analogon	54
3.14	Syntheseübersicht der Cumarin-Pentamidin-Analoga	55
3.15	Synthese der asymmetrisch substituierten Cumarin-Derivate	56
3.16	Synthese von 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan und 1-Brom-7-(4- Cyanophenoxy)heptan	57
3.17	Synthese der Vorstufen der Cumarin-Pentamidin-Analoga: die Nitril- verbindungen	58
3.18	Synthese von Cumarin-Pentamidin-Analogon mit <i>N</i> -Acetylcystein	59
3.19	Synthese über Pinner-Reaktion	60
3.20	Synthese von 4-(1-Brompentoxy)-benzamidin	61
3.21	Synthese eines Cumarin-Pentamidin-Analogon	61
3.22	Synthese von 4-Methoxybenzyl-4-nitrophenylcarbonat und <i>N</i> -(4-Methoxy- benzyloxycarbonyl)-4-amidino-1-(5-Brompentoxy)benzol	62
3.23	Synthese von Cumarin-Pentamidin-Analogon	63

3.24	Struktur der Fluorescein-Pentamidin-Analoga	65
3.25	Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogon (Esterverknüpfung) .	65
3.26	Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogon (Etherverknüpfung) .	66
3.27	Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogon (Etherverknüpfung) .	67
4.1	Entstehung eines H-Phosphonat-Diesters	70
4.2	Struktur des acylierten und bisaminoacylierten Dinukleotids	72
4.3	Mesomere Grenzformeln des 7-Hydroxycumarins	85
4.4	Reaktion des Pinner Salzes	86
4.5	Reaktion zum Acylamidin	88

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
<i>as</i>	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>basepair</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CTD	Cytidintriphosphat
d (NMR)	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclocarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation
<i>FM</i>	<i>Feeding Mix</i>
FT	Fourier Transformation
ges.	gesättigt
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HMBC	<i>Hetero Nuclear Multiple Bond Correlation</i>

HSQC	<i>Hetero Single Quantum Coherence</i>
i. Vak.	im Vakuum
IR	Infrarot
konz.	konzentriert
LB-Medium	<i>Lysogenic broth</i> -Medium
Lit.	Literatur
m (NMR)	Multipllett
m_c (NMR)	zentriertes Multipllett
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MM	<i>Mastermix</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrum
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD	Optische Dichte
org.	organisch
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
q (NMR)	Quartett
R_f	Retentionsfaktor
Raumtemp.	Raumtemperatur
RCWMDE	L-Arginin, L-Cystein, L-Methionin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, L-Tryptophan
RM	<i>Reaction Mix</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i>
s (NMR)	Singulett
<i>s</i>	<i>sense</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
t (NMR)	Tripllett
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UTP	Uridintriphosphat
wässr.	wässrig

1 Einleitung

Proteine kommen in allen biologischen Prozessen vor, sei es in der Signalübertragung, der Katalyse oder in der Genregulation. Nur aus zwanzig proteinogene Aminosäuren aufgebaut, können sie diese vielfältigen Funktionen ausüben. Das Interesse an der Identifizierung und Charakterisierung eines Proteins hat immens zugenommen, nachdem erkannt wurde, dass Arzneimittel an bestimmte Zielstrukturen binden [1, 2]. Das Interesse besteht vor allem in der Struktur- und Funktionsaufklärung von Membranproteinen, denn 60% der Wirkstoffziele sind Membranproteine. Eine wichtige Methode, um Zusammenhänge zwischen Sequenz, Struktur und Funktion zu erkennen, ist die Mutagenese, also der Austausch einzelner Aminosäuren. Allerdings ist sie in der ribosomalen Proteinsynthese auf neunzehn austauschbare proteinogene Aminosäuren beschränkt [3, 4]. Da die Auswahl begrenzt ist, ist nicht immer eine geeignete Aminosäure vorhanden, um spezifische Fragen zu Struktur-Funktionsbeziehungen einzeln beantworten zu können. Von Vorteil wäre, wenn ganz bestimmte sterische oder elektronische Eigenschaften einer Aminosäure in einem Protein verändert werden könnten. Zum Beispiel können die Nukleophilie oder die Acidität am aktiven Zentrum, Wasserstoffbrückendonatoren zu -akzeptoren oder die hydrophoben Eigenschaften verändert werden. Desweiteren können gezielte Einschränkungen in der Konformation des Proteins oder photoaktivierbare, fluoreszierende oder spinmarkierte Aminosäuren eingebaut werden, um das Spektrum der Strukturaufklärung zu erweitern [5, 6, 7]. Damit eine Untersuchung und Strukturaufklärung erfolgen kann, werden größere Mengen an Protein benötigt. Die Synthese von Membranproteinen ist allerdings in *in vivo* Systemen häufig schwierig, aufgrund ihrer hydrophoben Struktur. Doch mit der Entwicklung von *in vitro* Systemen zur Herstellung von Membranproteinen können größere Mengen gewonnen werden. Die Verwendung von unnatürlichen Aminosäuren ermöglicht es uns, das Protein auf jede erdenkliche Art zu manipulieren. Damit können Protein/Protein- oder Protein/Substrat-Wechselwirkungen bis ins kleinste Detail untersucht werden,

die bei einem Design von Wirkstoffen helfen können. Sobald die Struktur von einem Protein aufgeklärt wird, kann zum entwickeln von Wirkstoffen *Molecular Modeling* angewandt werden. Und in Kombination mit der zellfreien Proteinsynthese können Proteine mit unnatürlichen Aminosäuren in größeren Mengen hergestellt werden.

1.1 Proteinbiosynthese

Der Prozess der Translation findet am Ribosomen statt und ist ein komplexes Zusammenspiel von Transfer-RNA (tRNA), *messenger*-RNA (mRNA), Enzymen und vielen anderen Faktoren. Während der Transkription wird die gencodierende DNA abgelesen und in eine entsprechende mRNA übersetzt. An der entstehenden mRNA lagern sich die Ribosomen an und die Proteinsynthese wird gestartet. Die mRNA enthält die Aminosäuresequenz für das entstehende Protein. Das Bindeglied zwischen der Aminosäuresequenz und der Basensequenz DNA/mRNA ist der genetische Code. Dabei bilden drei Basen ein Triplet, die für eine Aminosäure codieren. Es gibt insgesamt 64 Codons, aber nur 20 kanonische Aminosäuren. Das bedeutet, dass mehrere Codons für eine Aminosäure codieren, der genetische Code ist degeneriert. Von den 64 Codons codieren drei nicht für eine Aminosäure, sondern für ein Terminationssignal [8]. Die Translation teilt sich in drei Phasen auf. In der Initialphase wird durch das Startcodon, das für die Aminosäure Methionin steht, die Proteinsynthese eingeleitet. Anschließend erfolgt die Elongationsphase, in der entsprechende Aminosäuren enzymatisch miteinander verknüpft werden. Die Aminosäuren befinden sich an einer tRNA, die sich spezifisch mit ihrem komplementären Codon (Anticodon) an die mRNA bindet. Beim Erreichen eines Stopcodon wird die dritte Phase, die Termination, eingeleitet. Durch die Bindung eines Terminationsfaktors wird die Proteinsynthese abgebrochen und das Protein freigegeben [9].

1.1.1 Die tRNA

Die tRNA ist ein Einzelstrang und besteht je nach Organismus aus 76 - 93 Ribonukleotiden. Durch Basenpaarungen zeigen alle bisher bekannten tRNAs eine kleeblättrige Sekundärstruktur auf. Das 5'-Ende ist phosphoryliert und durch die Ba-

senpaarungen entsteht am 3'-Ende ein Überhang von vier Basen, der immer $5'NCCA^{3'}$ lautet. An dem Adenosin ist eine freie OH-Gruppe, an der die Aminosäure gebunden ist. In der mittleren Schleife befindet sich das Anticodon, welches komplementär zu einem bestimmten Codon auf der mRNA ist. Die 3D-Struktur wurde in den Arbeitsgruppen um Klug und Rich unabhängig voneinander aufgeklärt [10, 11]. Demnach besitzen tRNAs als Tertiärstruktur eine L-Form, wobei die Enden des L von der Aminosäurebindungsstelle ($5'NCCA^{3'}$) und von der Anticodonschleife gebildet werden. Das bedeutet, dass die Aminosäure der Aminoacyl-tRNA recht weit vom Anticodon entfernt ist.

Die Aminosäure wird durch substratspezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetasen an die entsprechende tRNA gebunden. Die Bildung dieser Bindung ist thermodynamisch ungünstig. Deshalb muss die Carboxygruppe der Aminosäure aktiviert werden, damit eine Verknüpfung einer Aminosäure mit der 2'- oder 3'-OH-Gruppe an der Ribose am CCA-Ende überhaupt stattfinden kann. Die Aktivierung sowie Übertragung der Aminosäure werden von ein und derselben Aminoacyl-tRNA-Synthetase katalysiert. Die mit einer natürlichen Aminosäure beladene tRNA wird als Aminoacyl-tRNA oder als acylierte tRNA bezeichnet. Die Synthetasen arbeiten sehr spezifisch und das Erkennen der richtigen tRNA erfolgt hauptsächlich durch das jeweilige Anticodon, wobei auch andere Identifikationsmerkmale eine Rolle spielen [9].

1.2 Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine

In der Publikation von Chapeville *et al.* wurde gezeigt, dass tRNAs, die nicht mit ihrer entsprechenden Aminosäure beladen sind, trotzdem an der ribosomalen Proteinsynthese teilhaben können [12]. Basierend auf dieser Entdeckung wurden Methoden entwickelt, die es ermöglichen eine tRNA mit einer unnatürlichen Aminosäure zu beladen und diese an einer gewünschten Position in Proteine einzubauen. Der Einbau kann durch Zugabe von orthogonalen tRNAs oder tRNA/Synthetase-Paaren zum Zellslysat erfolgen. Orthogonal bedeutet, dass die tRNA nicht durch eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase erkannt wird und mit einer natürlichen Aminosäure beladen wird. Die Vorgehensweise, die unnatürliche Aminosäure an einer bestimmten Stelle einzuführen, wurden schon in der Literatur beschrieben. Im folgenden werden drei

Methoden näher beschrieben:

Die *frameshift* Suppression nutzt tRNAs, die anstatt eines Triplets, ein Quartett-Codon besitzen. Schon 1968 wurde durch S. Riyasaty und J. F. Atkins gezeigt, dass solche tRNAs mit mutierter Leserasterverschiebung in *Salmonella* ebenfalls vom Ribosomen akzeptiert wurden [13]. Für den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren wurden Untersuchungen unternommen, welche Kombinationen an 4-Basen Codons in der Proteinsynthese am effizientesten sind [14]. In Streptavidin wurde zum Beispiel Nitro-Phenylalanin und andere unnatürlichen Aminosäuren mit Hilfe der *frameshift*-Methode erfolgreich eingebaut [15, 16].

Im Gegensatz zu der *frameshift*-Methode verwendet die *sense* Suppression Triplet-Codons, die zwar für eine natürliche Aminosäure codieren, aber in einem Organismus entweder selten oder gar nicht vorkommen [17]. Am wichtigsten ist aber die *nonsense* Suppression.

1.2.1 Nonsense-Suppression-Methode

Eine weit verbreitete Methode zum Einbau von unnatürlichen Aminosäuren, die ein Triplet-Codon verwendet, ist die *Nonsense* Suppression. Sie wurde erstmals 1989 durch P. G. Schultz und A. R. Chamberlin unabhängig voneinander beschrieben [18, 19]. Hierfür wird für den ortsspezifischen Einbau der unnatürlichen Aminosäure ein Stopcodon verwendet. Von den insgesamt 64 Codons, die für die Translation verwendet werden, existieren drei Triplets, die nicht für eine natürliche Aminosäure, sondern für ein Terminationssignal für die Translation stehen. Das sind die Codons **TAG** (*amber*), **TAA** (*ochre*) und **TGA** (*opal*). Je nach Organismus kommen sie unterschiedlich häufig vor. Will man ein bestimmtes System nutzen, sollte vorher in Erfahrung gebracht werden, wie die prozentuale Häufigkeit der Stopcodons ist, da der Einbau der unnatürlichen Aminosäure an der Position des Stopcodons immer in Konkurrenzkampf mit der Bindung der entsprechenden Terminationsfaktoren steht [20]. In *E. coli* Lysaten kann zum Beispiel nur das *amber*-Stopcodon verwendet werden und die beiden anderen Stopcodons *ochre* und *opal* nicht [21, 22, 23]. Im allgemeinen kommt das *amber*-Stopcodon am seltensten vor und findet daher auch am häufigsten Verwendung in der *nonsense* Suppression.

In die gencodierende DNA kann durch gezielte Mutation ein Stopcodon **TAG** an der gewünschten Position eingeführt werden. Damit der Einbau einer Aminosäure auch erfolgt, wird noch eine tRNA benötigt, die mit der nicht natürlichen Aminosäure be-

laden ist und das komplementäre Anticodon beinhaltet (misacylierte tRNA_{CUA}^{uua}). Die misacylierte tRNA muss zusätzlich zwei Kriterien erfüllen: 1. Sie muss vom Ribosomen akzeptiert werden, sodass die Aminosäure eingebaut wird. 2. Die tRNA muss orthogonal sein, d. h. sie darf nicht von einer aminoacyl tRNA-Synthetase erkannt werden, da sie sonst mit einer natürlichen Aminosäure beladen wird und man eine Mischung von Proteinen erhält. Viele orthogonale tRNAs wurden bereits in unterschiedlichen Organismen untersucht und ihre Effizienz im Einbau einer unnatürlichen Aminosäure bestimmt und verglichen [22].

1.2.2 Synthese der misacylierten transfer-RNA

Die Synthese der misacylierten tRNA_{CUA}^{uua} kann über rein enzymatische, rein chemische oder über eine Kombination von chemischen und enzymatischen Methoden erfolgen. Die rein enzymatische Methode nutzt die gut untersuchte Methode der *run off*-Transkription zur Darstellung kompletter tRNA [24]. Bei der *run off* Transkription erfolgt der Abbruch der Synthese nicht durch ein Stoppsignal. Das Enzym hört auf, die RNA herzustellen, wenn es das Ende der DNA erreicht hat, da die DNA linearisiert vorliegt. Die Beladung der tRNA mit einer Aminosäure basiert auf der Verwendung von aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Synthetasen haben eine sehr hohe Substratspezifität, deshalb müssen sie häufig modifiziert werden, damit sie eine unnatürliche Aminosäure erkennen und die tRNA damit beladen [25]. Deshalb ist die Bandbreite an unnatürlichen Aminosäuren etwas eingeschränkt und nicht alle gewünschten Eigenschaften können auf diese Weise übertragen werden. Die chemische Synthese beruht auf der von M. H. Caruthers entwickelten Phosphor-Triester-Methode in Abbildung 1.1 [26]. Mittlerweile existieren Synthese-Maschinen mit denen Oligonukleotide bis zu einer Länge von 200 Basen automatisch hergestellt werden können. Während der Synthese entstehen reaktive Tetrazolide, sodass die Kupplungen mit sehr guten Ausbeuten und Geschwindigkeiten verläuft. Das Oligonukleotid wird über eine Festphasensynthese aufgebaut. Zum Anknüpfen der neuen Base wird immer ein Zyklus durchlaufen, der die folgende Schritte beinhaltet: 1. Entschützung der 5'-OH-Gruppe. 2. Kopplung eines Phosphoramidits. 3. *Capping* der 5'-Enden von nicht reagierten Basen, damit diese im nächsten Kopplungsschritt ausgeschlossen werden. 4. Oxidation des Phosphittriesters zum Phosphotriester [27, 26]. Bei einer RNA-Synthese muss die 2'-OH-Gruppe ebenfalls geschützt werden. Durch die zusätzliche Schutzgruppe ist die Kopplungsausbeute generell geringer als bei der

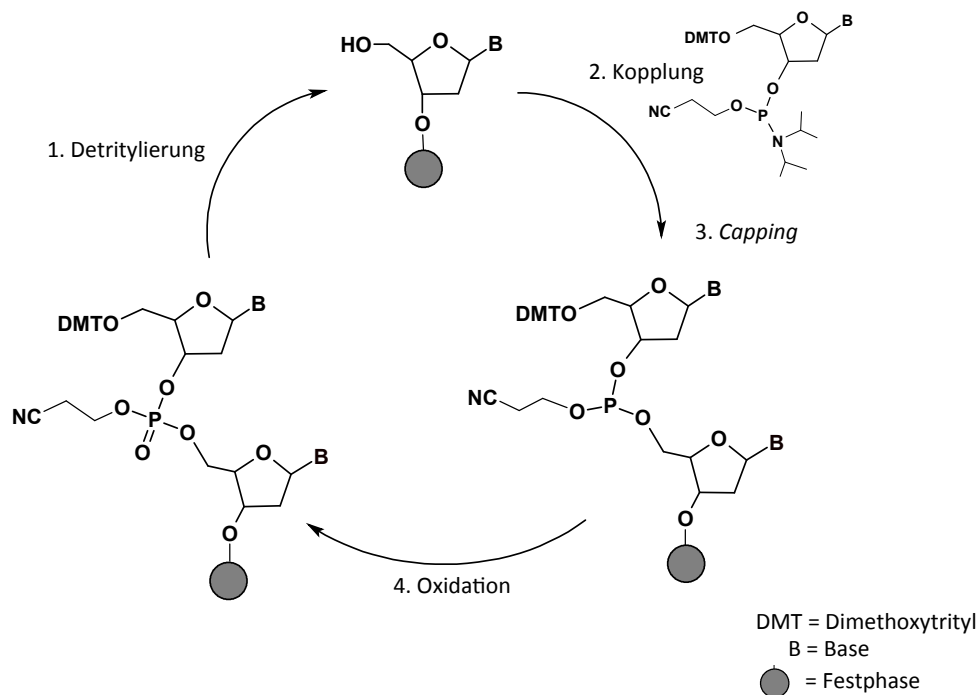


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Phosphor-Triester-Methode.

DNA-Synthese. Die Aminosäure wird anschließend chemisch oder enzymatisch angebracht. Allerdings ist hier die chemische Kopplung nicht ganz trivial, da die gesamte RNA viel freie OH-Gruppen besitzt, die reagieren können.

Die am meisten verwendete Methode zur Darstellung der misacylierten $tRNA_{CUA}^{uaa}$ ist die Kombination der chemischen und der enzymatischen Methode (Abbildung 1.2), die durch die Arbeitsgruppe um S. Hecht etabliert wurde [28, 29]. Alle tRNAs besitzen am 3'-Ende die Basenfolge CCA. An dem Adenosin ist die Aminosäure immer über eine Esterbindung gebunden. Für die Synthese wird eine verkürzte tRNA (tRNA(-CA)) benötigt, bei dem am 3'-Ende genau die beiden Nucleotide Cytidin und Adenosin fehlen. Die tRNA(-CA) wird molekularbiologisch mittels der *run off* Transkription hergestellt. Die zweite Komponente ist ein Dinucleotid mit den beiden fehlenden Basen Cytosin und Adenin. Das Dinucleotid wird chemisch unter Kuppelung von Phosphoramiditen, wie bei der Phosphor-Triester-Methode hergestellt [18]. Anschließend erfolgt die Aminoacylierung des Dinucleotids mit einer unnatürlichen Aminosäure. Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass alle Aminosäuren, unabhängig von ihrer Struktur, verestert werden können. Des Weiteren wird das Problem der vielen reaktiven Zentren innerhalb der vollständigen tRNA vermieden. Die beiden Komponenten tRNA(-CA) und das Dinucleotid können mittels einer T4-RNA-

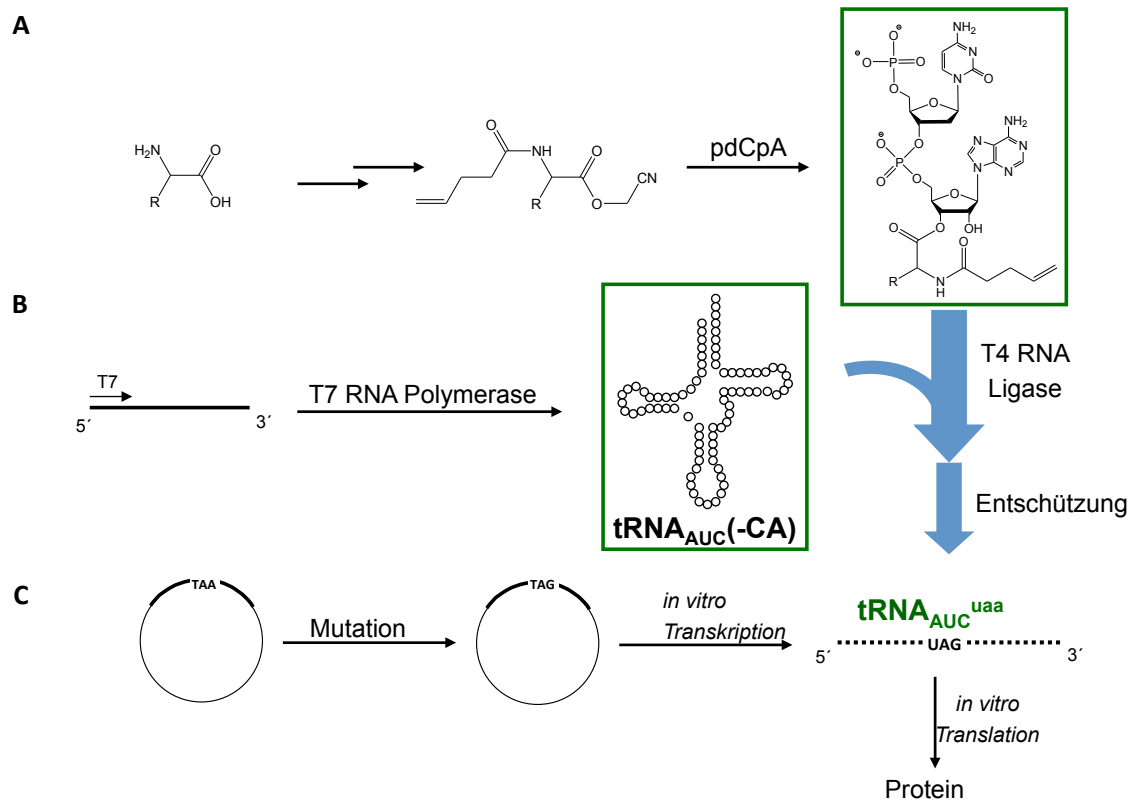


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung zur Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine. **A:** Veresterung der unnatürlichen Aminosäure mit pdCpA (pdCpA-uaa). **B:** *Run off*-Transkription zur Herstellung der verkürzten tRNA und anschließende Ligation mit pdCpA-uaa. **C:** Mutation der DNA und *In vitro* Transkription/Translation zur Synthese eines Proteins.

Ligase miteinander zu der vollständigen $tRNA_{CUA}^{uaa}$ verknüpft werden. Anfangs wurde das Dinukleotid pCpA, ein RNA-Dimer, für den Ligationsschritt verwendet. Hierbei bestand das Problem der korrekten 3' -5' Verknüpfung der Zucker und des enzymatischen Abbaus durch RNAsen. Die Synthese der misacylierten tRNA wurde wesentlich vereinfacht durch die Verwendung eines DNA/RNA-Hybrids (pdCpA) anstatt des RNA-Dimers pCpA (Abbildung 1.3). Die Synthese wurde durch Schultz *et al.* beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die tRNA gegenüber RNAsen stabiler ist. Vor allem ist sie in der Proteinsynthese biologisch genauso aktiv, wie die tRNA, die mit pCpA hergestellt wurde [30]. Die misacylierten tRNAs können sowohl in einem *in vivo* als auch in einem *in vitro* Translationssystem eingesetzt werden.

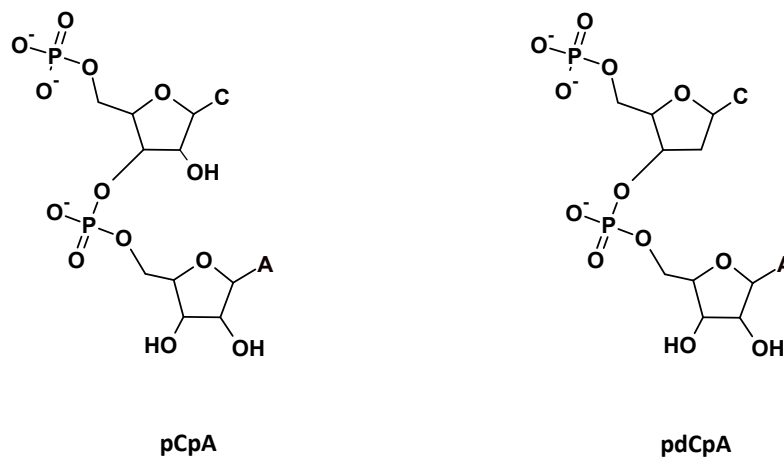


Abbildung 1.3: Struktur von RNA-Dimer pCpA und RNA/DNA-Hybrid pdCpA. Das pCpA besteht aus zwei Ribonukleotiden und das pdCpA aus einem Desoxyribonukleotid und einem Ribonukleotid.

1.2.3 Translationssysteme

Mit der veränderten DNA und der misacylierten tRNA fehlt nur noch ein System, in dem die Proteinsynthese erfolgen kann. Der Einbau der unnatürlichen Aminosäure wurde schon erfolgreich *in vivo* sowie *in vitro* getestet. Ein geeignetes *in vivo* Translationssystem stellen *Xenopus* Oocyten dar [31]. Vor allem Ionen- oder Solutkanäle, die durch den Einbau einer unnatürlichen Aminosäure verändert wurden, können

am besten untersucht werden. Die Vorteile des System sind, dass mit der Injektion der misacylierten tRNA und mRNA Protein hergestellt werden kann und das hergestellte Protein auch richtig gefaltet in die Plasmamembran eingebaut wird [6]. Des Weiteren können die eingebauten Proteine gleich in Schwell- oder elektrophysiologischen Tests untersucht werden.

Allerdings können in Oocyten, wie auch in anderen *in vivo* Systemen, nicht alle Proteine hergestellt werden. Vor allem bei zytotoxischen oder Membranproteinen ist es problematisch. Membranproteine werden entweder abgebaut oder beeinflussen die Translokationssysteme. Zytotoxische Proteine können zum Absterben der Zelle führen, sodass entweder gar keine oder nur eine geringe Mengen an Protein erhalten werden. Eine Alternative für die *in vivo* Proteinsynthese ist die zellfreie Synthese.

1.3 Zellfreie Proteinsynthese

Bereits in den 1950'er Jahren wurde durch die Arbeitsgruppen um H. Borsook und E. F. Gale festgestellt, dass Proteinsynthese auch ohne intakte Zellmembran stattfinden kann. Das isolierte Cytoplasma deckt all die benötigten Komponenten für eine Proteinsynthese ab [32, 33]. Durch intensive Forschung und Weiterentwicklung der *in vitro* Systeme, können mittlerweile aus Milliliter-Ansätzen, Proteine in Milligramm-mengen gewonnen werden [34, 35]. Vom Prinzip her kann das Lysat für eine zellfreie Synthese aus allen möglichen Organismen stammen. Die am meisten verwendeten Extrakte stammen aus *E. coli*, Weizenkeimen und Kaninchen-Retikulozyten. Generell ist der *E. coli* basierte S30-Extrakt am einfachsten herzustellen und liefert die höchsten Ausbeuten. In dem Extrakt befinden sich Ribosomen, Translationsfaktoren, aminoacyl-tRNA Synthetase und weitere Faktoren. Damit eine effiziente Proteinsynthese erfolgen kann, müssen weitere Zusätze erfolgen wie eine RNA-Polymerase, andere Enzyme, die die Energieversorgung des Systems aufrechterhalten, sowie entsprechende Substrate für die Enzyme. Mit der letzten Komponente, der *template* DNA, kann die Synthese starten. Mit der Entwicklung des *Continuous Exchange Cell Free*-Verfahrens (CECF-System, Abbildung 1.4) konnten die Reaktionszeiten bis zu einem Tag verlängert und die Effizienz erhöht werden [36]. Das Verfahren basiert auf der kontinuierlichen Versorgung von Substraten, sowie der Verdünnung von Abbauprodukten über eine Dialysemembran. Der Austausch erfolgt über eine semi-permeable Membran, die zwei Kompartimente miteinander verbindet. In dem einen

Kompartiment befindet sich der *Reaction Mix*, in der die Proteinsynthese stattfindet. Die dort entstehenden niedermolekularen Substanzen können durch die semipermeable Membran in das zweite Kompartiment gelangen, in dem sich der *Feeding Mix* befindet. Im *Feeding Mix* sind unverbrauchte Substrate enthalten, die über Diffusion in den *Reaction Mix* gelangen und so die Synthese aufrechterhält. Der große Vorteil eines zellfreien Systems ist die vielfältige Möglichkeit dieses zu manipulieren. Für strukturelle Untersuchungen können neben den unnatürlichen Aminosäuren auch isotoopenmarkierte Aminosäuren eingesetzt werden [37, 38, 39, 40]. Weiterhin kann der Ansatz mit proteinstabilisierenden Substanzen versetzt werden, wie zum Beispiel Proteaseinhibitoren, Chaperonen oder Kofaktoren [41, 42]. Vorallem der Zusatz von solubilisierenden Detergenzien bei der Synthese von Membranproteinen hat an Bedeutung gewonnen.

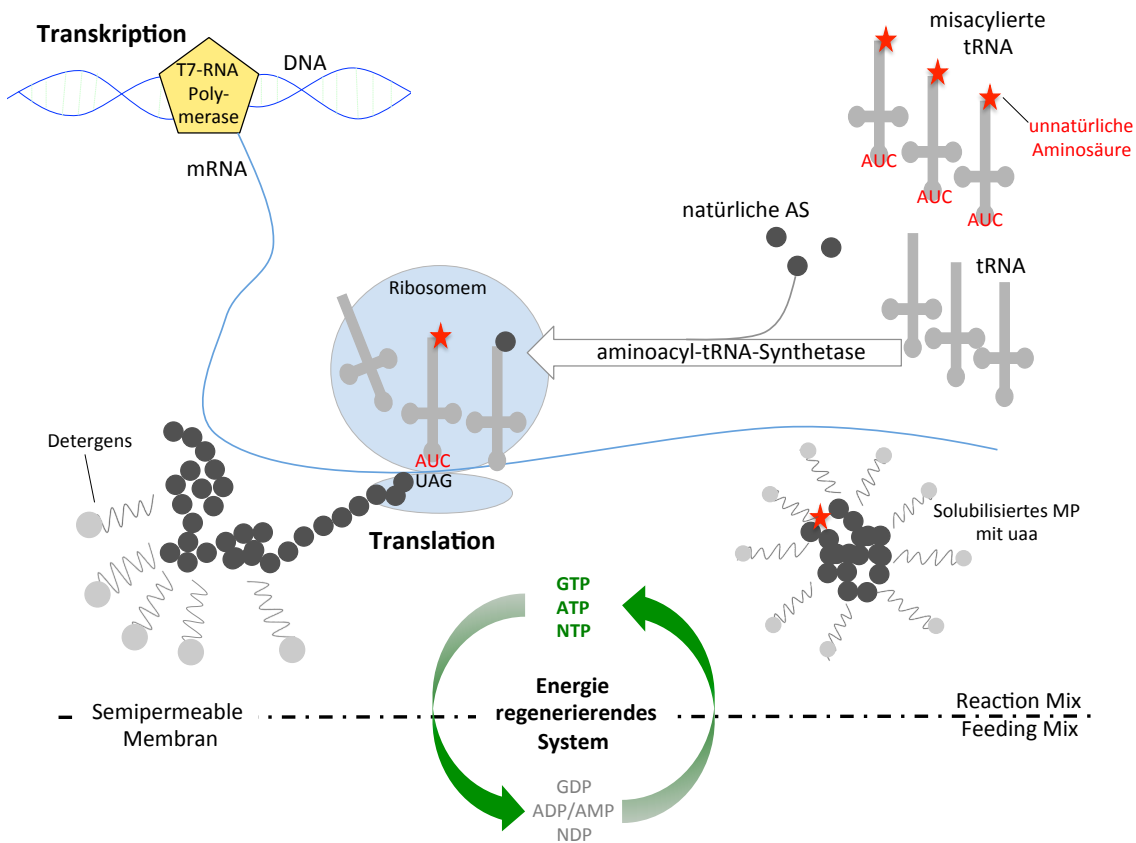


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des *Continuous Exchange Cell Free*-Verfahrens. Abbildung in Anlehnung an [43].

1.3.1 Zusatz von Detergenzien zur Herstellung von Membranproteinen

Membranproteine haben hydrophobe Oberflächen und fallen deshalb während der Synthese aus. Das entstandene Präzipitat kann mit milden Detergenzien resolubilisiert werden, aber die zwischenzeitliche Denaturierung kann die Funktionalität beeinflussen [44]. Daher werden die Ansätze mit Detergenzien versetzt. Sie können aufgrund ihres amphiphilen Charakters Mizellen bilden. Mizellen sind kleine Aggregate aus 40 - 100 amphiphilen Molekülen, die sich in Wasser spontan zusammenlagern. Dabei zeigen die hydrophilen Kopfgruppen nach aussen und die hydrophoben Bereiche nach innen. Solche Mizellen bilden sich aber nur ab einer bestimmten Konzentration an Detergens in wässriger Lösung (*critical micelle concentration*, CMC) [45]. In diese Mizellen werden die hydrophoben Membranproteine während oder direkt nach der Synthese integriert. Viele unterschiedliche Detergenzien existieren, die mit der zellfreien Proteinsynthese kompatibel sind und mit denen sehr hohe Ausbeuten erreicht werden können. Allerdings ist eine hohe Ausbeute keinesfalls eine Garantie dafür, dass das Protein in der richtigen Faltung vorliegt und funktionell ist [46]. Eine effektive Methode für die Produktion von Membranproteinen sollte zwei generelle Probleme lösen. 1. Das Detergens sollte die Faltung der entstehenden Proteine in ihre native Form fördern. 2. Es sollte eine membranähnliche Umgebung schaffen und das Membranprotein in wässriger Lösung solubilisieren und stabilisieren [47].

Allerdings haben einige Studien ergeben, dass Detergenzien dazu tendieren Membranproteine zu inaktivieren, weil diese nicht genügend stabilisiert werden [48, 49]. Detergenzien werden schon seit Jahren verwendet, um Proteine aus ihrer Membran zu isolieren. Damit dieses erfolgen kann, müssen die Wechselwirkungen zwischen Protein/Detergens stärker sein als zwischen Protein/Protein oder Protein/Lipid. Demzufolge müssen sie eine dissoziierende Wirkung haben [50, 51, 52, 53]. Die Stabilität ist abhängig von der Protein/Protein- und Protein/Lipid-Wechselwirkung. Damit Membranproteine eine Funktion zeigen, müssen sie die richtige Faltung aufweisen. Die Faltung wird durch verschiedene Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren erzeugt [54]. Neben Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und Van-der-Waals Wechselwirkungen stabilisieren hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den transmembranen Segmenten das Membranproteins in ihrer nativen Faltung. Da Detergenzien/freie Mizellen die Fähigkeit besitzen diese hydrophoben Wechselwir-

kungen zu stören, neigen sie dazu, Membranproteine zu destabilisieren.

Damit Membranproteine besser stabilisiert werden, wurden Substanzen entwickelt, die eine membranähnlichere Umgebung schaffen können, wie zum Beispiel *Nano-disks*, fluorierte oberflächenaktive Substanzen oder Amphipole.

1.3.2 Amphipole

Membranproteine fangen an zu aggregieren und fallen aus, sobald die CMC des Detergens unterschritten wird und keine anderen oberflächenaktive Substanzen vorhanden sind. Daher sind in einer Lösung immer freie Mizellen vorhanden, die mit den Protein-Protein-Wechselwirkungen konkurrieren können. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden Substanzen entwickelt, die eine hohe Affinität zur hydrophoben Oberfläche des Proteins besitzen, sodass eine geringe Konzentration ausreicht, um diese in Lösung zu halten. Solche Substanzen sind die Amphipole. Amphipole sind kurze Polymere, die eine große Anzahl an flexiblen, hydrophoben Seitenketten tragen, die mit der hydrophoben Oberfläche eines Membranproteins interagieren können. Sie bilden keine kovalenten Bindungen aus, sondern werden auf der hydrophoben Oberfläche des Proteins adsorbiert. Durch die vielen hydrophoben Seitenketten wird ein multipler Kontakt eines Amphipolmoleküls mit dem Protein ermöglicht [50, 55]. Amphipole haben im Gegensatz zu Detergenzien nur eine schwach dissoziierende Wirkung und stellen keine Konkurrenz zur Protein-Protein-Wechselwirkungen dar. Dadurch können sie Proteine besser stabilisieren und sie sind länger funktionell [56, 57]. Wenn die Amphipolkonzentration nicht zu hoch ist, können sich in Amphipol-Lösungen auch Oligomere bilden [58, 59].

Im nächsten Kapitel erfolgt eine Einleitung über Aquaglyceroporine aus *Trypanosoma brucei* und den aktuellen Stand der Forschung.

1.4 *Trypanosoma brucei*

Die Afrikanische Schlafkrankheit wird durch die Erreger *Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense* hervorgerufen. In Westafrika tritt hauptsächlich *T. b. gambiense* auf, während in Ostafrika Infektionen durch *T. b. rhodesiense* vorherrschen. Dabei verläuft die Infektion durch *T. b. gambiense* chronisch und *T. b. rhodesiense* eher akut [60, 61]. Trypanosomen sind extrazellulär lebende, eingeißellige Flagellaten und werden durch Tsetse-Fliegen auf den Menschen übertragen. Die Krankheit wird in zwei Stadien eingeteilt. Im ersten Stadium befindet sich der Erreger zunächst in der Blutbahn und im Lymphsystem und verteilt sich dadurch im ganzen Körper. Die Symptome für das erste Stadium sind eher unspezifisch. Dadurch wird die Krankheit häufig erst sehr spät entdeckt. Mit dem Eindringen der Trypanosomen in das zentrale Nervensystem beginnt das zweite Stadium. Dort verursachen sie eine schleichende Enzephalopathie, die unbehandelt meist zum Tod führt [62, 63].

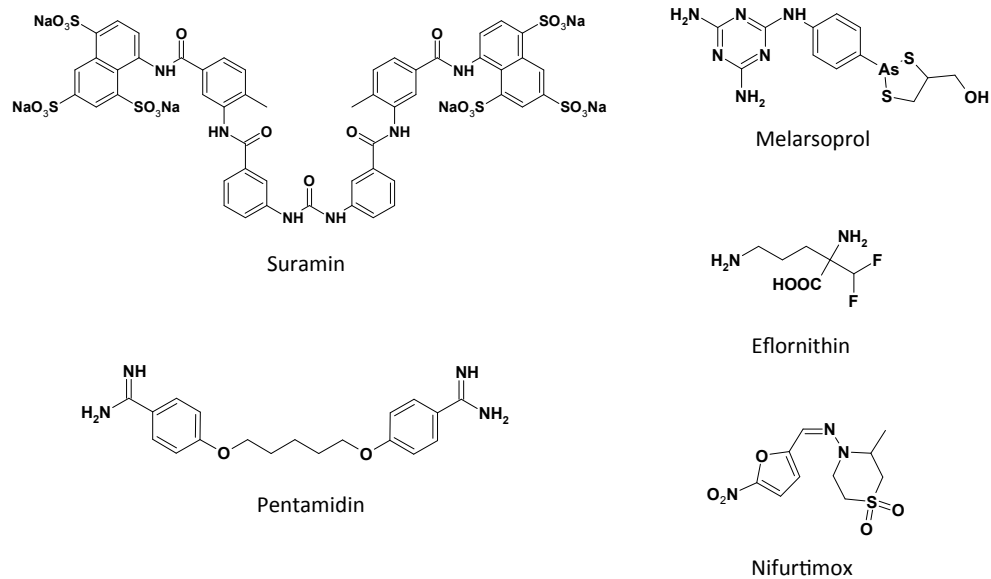


Abbildung 1.5: Strukturen der eingesetzten Chemotherapeutika. Die Substanzen Suramin und Pentamidin werden für die 1. Phase von Trypanosomiasis und Melarsoprol, Eflornithin und Nifurtimox werden für die 2. Phase eingesetzt.

Die Chemotherapie der Afrikanischen Schlafkrankheit ist sehr begrenzt. Zur Zeit gibt

es nur fünf Wirkstoffe, die aber nicht in beiden Stadien eingesetzt werden können (Abbildung 1.5). Dabei sind Pentamidin und Melarsoprol, die wirksamsten Verbindungen gegen Trypanosomiasis. Sie wurden vor mehr als fünfzig Jahren eingeführt. Diese Wirkstoffe sind jedoch toxisch und schwierig zu applizieren. Ein großes Problem ist die vermehrte Resistenzbildung gegenüber Pentamidin und Melarsoprol. Eine Alternativtherapie oder Impfstoffe existieren bis heute nicht [64]. Die Schwierigkeit, neue Wirkstoffe zu entwickeln, ist darin begründet, dass die Aufnahme- und Wirkmechanismen teilweise noch ungeklärt sind. Da Pentamidin und Melarsoprol die wirksamsten und billigsten Verbindungen darstellen, wurde in dem Bereich intensiver geforscht. Neue Erkenntnisse über den Aufnahme- und Wirkmechanismen sollen dabei helfen neue Wirkstoffe zu entwickeln.

1.4.1 Kreuzresistenzen gegenüber Melarsoprol und Pentamidin

Resistenzen tauchen im Allgemeinen auf, wenn eine genetische Änderung stattfindet, die sich auf die Aufnahme, den Export, auf den Wirkstoffmetabolismus oder auf Wirkstoff-*Target*-Wechselwirkungen auswirkt. Bei Trypanosomen erfolgt die Aufnahme von wichtigen Nährstoffen aus dem Blut des Wirtes. Demzufolge sind viele Rezeptoren und Transporter auf der Zelloberfläche und in der Flagellumtasche vorhanden. Wirkstoffe können ebenso durch Transporter in die Zellen gelangen. In der Flagellumtasche finden auch Prozesse wie die Endo- und Exocytose statt [65]. Kreuzresistenzen gegenüber Melarsoprol und Pentamidin wurde bereits 1951 beobachtet [66]. Vierzig Jahre später konnte geklärt werden, dass der P2/AT1-Nukleosidtransporter die Aufnahme sowohl von Melarsoprol als auch von Pentamidin in die Zelle ermöglicht [67, 68, 69]. Zwar werden Melarsoprol und Pentamidin über den Nukleosidtransporter aufgenommen, allerdings ist er nicht der Hauptaufnahmeweg. P2/AT1-*Knockout*-Versuche haben ergeben, dass die Resistenz sich nur um das Zwei bis Dreifache erhöht hatte. Daher war klar, dass es für diese beiden Substanzen noch einen anderen Transporter geben muss, der die Aufnahme in die Zelle ermöglicht [70]. In einen *genome scale RNAi Screen* wurde ein Zusammenhang zwischen Aquaglyceroporinen (AQP2 und AQP3) aus den Trypanosomen und der Kreuzresistenz gegenüber Melarsoprol und Pentamidin entdeckt [71]. Doppel *Knock-*

out-Versuche von AQP2 und AQP3 haben ergeben, dass die *knockout* Stämme im Gegensatz zum Wildtyp zweifach resistenter gegenüber Melarsoprol und fünfzehnfach resistenter gegenüber Pentamidin waren.

1.4.2 Aquaglyceroporine aus Trypanosomen

Aquaglyceroporine sind Membranproteine, die selektiv Wasser und kleine ungeladene Moleküle wie z.B. Glycerol leiten [72, 73]. In der Membran liegen sie als Tetramere vor, wobei jedes Monomer eine eigenständige Pore darstellt [74, 75]. Das Monomer besteht aus sechs transmembranären Helices. Diese Helices werden durch fünf Schleifen (A-E) miteinander verbunden (Abbildung 1.6). Auf den Schleifen B und E befinden sich zwei Halbhelices (HB und HE), die sich von entgegengesetzten Seiten in der Membran zusammenlagern. Die N- und C-Termini sind intrazellulär. An den Enden der Halbhelices HB und HE befindet sich die NPA-Region, ein charakteristisches Strukturmerkmal der Aqua(glycero)porine. Die NPA-Region besteht aus den Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin und bildet eine zentrale Engstelle des Kanals. Sie hat nicht nur die Funktion zum Größenausschluss, sondern schliesst auch Kationen aus [76, 77]. Der Selektivitätsfilter entfaltet aber seine volle Funktion nur in der Kombination mit der aromatischen/Arginin-Region (ar/R), welche das zweite charakteristische Strukturmerkmal darstellt. Sie besteht aus vier Aminosäuren und bildet die zweite Engstelle des Kanals. Der Porendurchmesser bei Aquaglyceroporinen beträgt etwa 3.4 Å [78]. Die ar/R-Region aus dem Aquaglyceroporin in *E. coli* (EcGlpF) besteht aus den Aminosäuren Tryptophan (W48), Glycin (G191), Phenylalanin (F200) und Arginin (R205), wodurch dieser Bereich stark amphipatisch wird. Deshalb zeigt sie gute Glycerol-, aber geringere Wasserleitfähigkeit [79]. Neben der Funktion als Größenfilter bildet die ar/R-Region auch eine energetische Barriere für Protonen, die durch die positiv geladene Seitenkette des Arginins hervorgerufen wird [76, 77].

In Trypanosomen gibt es drei Aquaglyceroporine, die alle Wasser, Glycerol, Harnstoff [81] und Ammoniak leiten [82]. In der Blutzellenform sind AQP1 und AQP3 in der Plasmamembran und in der Flagellumtasche [83] und AQP2 nur in der Flagellumtasche lokalisiert. TbAQP1 und auch TbAQP3 besitzen die konventionellen Selektivitätsfilter, das NPA/NPA-Motiv und die ar/R-Region. TbAQP2 hingegen besitzt keine NPA/NPA-, sondern ein NPA/NPS-Motiv. Auch wenn Alanin gegen Serin ausgetauscht ist, funktioniert sie noch als Kationenfilter. Eine Besonderheit

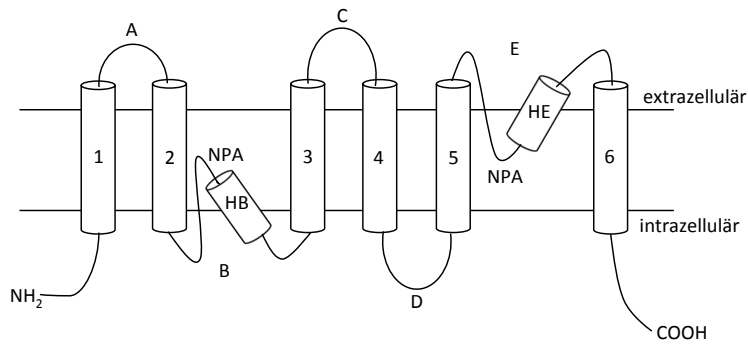


Abbildung 1.6: Aufbau von Aquaglyceroporinen. Die Membranhelices 1 - 6 (Zylinder) werden über die Schleifen A - E miteinander verbunden. Die beiden Halbhelices HB und HE lagern sich zu einer Pseudohelix zusammen und bilden die NPA-Region aus. Abbildung in Anlehnung an [80]

zeigt sie in der ar/R-Region. Dort ist das hochkonservierte Arginin gegen Leucin ausgetauscht. Welche Bedeutung dieser Austausch für das Trypanosomen hat, wird im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt und diskutiert.

1.4.3 Aquaglyceroporin 2 aus *Trypanosoma brucei* - Pentamidinaufnahme?

Trypanosomen besitzen zwar drei Aquaglyceroporine, aber nur TbAQP2 und TbAQP3 spielen eine Rolle für die Entstehung der Resistenz gegenüber Melarsoprol und Pentamidin [71]. In einer weiteren Publikation wurden beide Aquaglyceroporine einzeln untersucht. Nur TbAQP2-*knockout*-Stämme zeigten Resistenz gegenüber Pentamidin [84].

Eine Vermutung, wie Pentamidin aufgenommen wird, wurde durch die Gruppe um D. Horn aufgestellt. Demnach wird Pentamidin durch den Nukleosidtransporter in die Zelle eingeschleust, aber die Hauptaufnahme erfolgt über eine direkte Passage von Pentamidin durch TbAQP2 aufgrund ihres ungewöhnlichen Selektivitätsfilters [84].

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen drei Projekte bearbeitet werden:

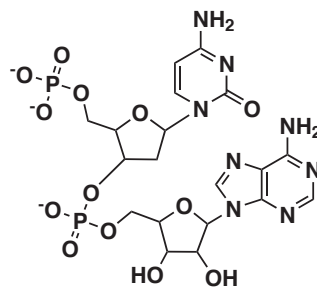
Im ersten Projekt soll zunächst im Arbeitskreis die Methode zum Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine etabliert werden. Als Methode wird die *nonsense* Suppression ausgewählt. Dafür sollen die beiden Bausteine, das Dinukleotid pdCpA und die verkürzte tRNA(-CA), hergestellt werden.

Das zweite Projekt besteht in der Untersuchung von Amphipolen in der zellfreien Proteinsynthese. Die zellfreie Proteinsynthese ist bereits im Arbeitskreis etabliert worden. Meine Aufgabe ist es, kommerziell erhältliche Amphipole zu testen und sie mit den üblicherweise eingesetzten Detergenzien zu vergleichen. Dazu sollen unterschiedliche Membranproteine in Amphipolen und in Detergenzien zellfrei hergestellt werden. Die Membranproteine sind mit GFP als Faltungskontrolle fusioniert. Mit Fluoreszenzmessungen und Western Blots können die hergestellten Proteine untersucht werden.

Das dritte Projekt besteht in der Untersuchung der Pentamidinaufnahme in *Trypanosoma brucei*. Dafür sollen Pentamidin-Analoga synthetisiert und an Hefeplasten, die Aquaglyceroporine aus *Trypanosoma brucei* exprimieren, getestet werden. Mit der Testung können Rückschlüsse auf den Mechanismus der Pentamidinaufnahme in Trypanosomen gezogen werden.

3 Synthesen und Ergebnisse

3.1 Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine



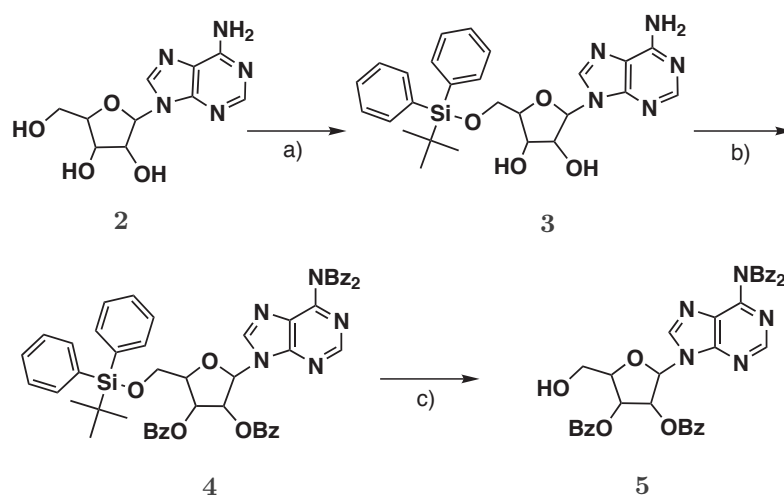
1

Schema 3.1: Struktur des Dinukleotids 1.

Für den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine sollte zunächst die misacylierte tRNA hergestellt werden, welche das Anticodon zum *amber* Stopcodon TAG beinhaltet (tRNA_{CUA}^{uaa}). Die Herstellung der misacylierten tRNA wurde bereits 1989 durch Robertson *et al.* beschrieben [30]. Die tRNA_{CUA}^{uaa} besteht aus zwei Komponenten, einem Dinukleotid und einer verkürzten tRNA ($\text{tRNA}_{CUA}(-CA)$), die am Ende miteinander verknüpft werden. Das Dinukleotid 1 wurde in sieben Stufen chemisch synthetisiert und die verkürzte tRNA wurde molekularbiologisch mit Hilfe der *run-off* Transkription hergestellt.

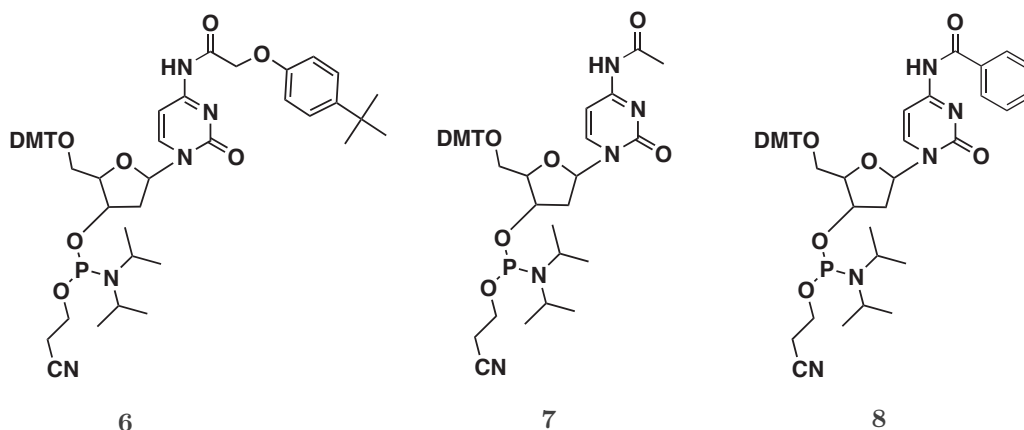
3.1.1 Synthese des Dinukleotids

Das Dinukleotid **1** enthält die Basen Cytosin und Adenin (**2**) (Schema 3.1). Die Verknüpfung der beiden Nucleoside erfolgte über eine Phosphodieestergruppe. Zusätzlich musste die Verknüpfung von 3' nach 5' erfolgen, daher wurden geeignete Schutzgruppen eingeführt. Die Synthese des Dinukleotids verlief über sieben Stufen und wurde in Anlehnung an literaturbekannte Vorschriften durchgeführt [30, 85]. Zunächst wurde das Adenosin (**2**) über drei Stufen geschützt (Schema 3.2) und anschließend mit einem geschützten Cytidin in vier Stufen zum Dinukleotid **1** umgesetzt.



Schema 3.2: Synthese von $N^6,N^6,2',3'$ -O-Tetrabenzoyladenine (**5**). a) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid, abs. Pyridin, 0 °C, dann Raumtemp., 16 h. b) Benzoylchlorid, DCM, Raumtemp., 16 h. c) Tetra-*n*-butylammoniumfluorid, THF, Raumtemp., 1 d.

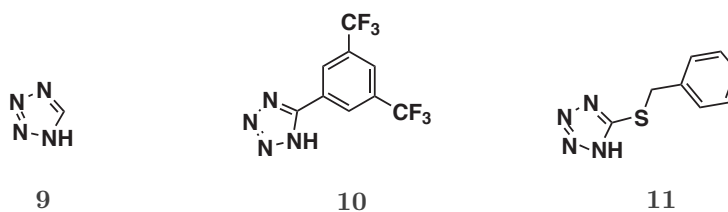
Für die Synthese des benzoylgeschützten Adenosins **5** wurde zunächst selektiv die 5'-OH-Gruppe mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid geschützt. Nach Umkristallisation aus Ethanol konnte das Produkt **3** in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 64 % erhalten werden. Anschließend wurden die OH-Gruppen in Position 2' und 3' sowie die Aminogruppe am Adenin in einem Schritt mit Benzoylchlorid geschützt. Nach säulenchromatografischer Reinigung wurde das geschützte Adenosin **4** mit einer Ausbeute von 84 % erhalten. Damit eine Kopplung des Cytidins an der 5'-Position erfolgen kann, wurde die Silylschutzgruppe mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid wieder abgespalten. Nach säulenchromatografischer Reinigung konnte die Verbindung **5**



Schema 3.3: Eingesetzte Cytidine als Phosphoramidite. Die Aminogruppe der Verbindung **6** ist mit einer 4-*tert*-Butylphenoxyacetyl-Gruppe (CTac) geschützt, **7** mit einer Acetylgruppe (CAC) und **8** mit einer Benzoylgruppe (CBz).

mit einer Ausbeute von 60 % erhalten werden. Cytidine mit einer Phosphoramidit-Gruppe an der 3'-Position und unterschiedlichen Schutzgruppen an der Aminogruppe des Cytosins sind kommerziell erhältlich. Für die Synthese standen drei Cytidine zur Verfügung, die in Schema 3.3 dargestellt sind.

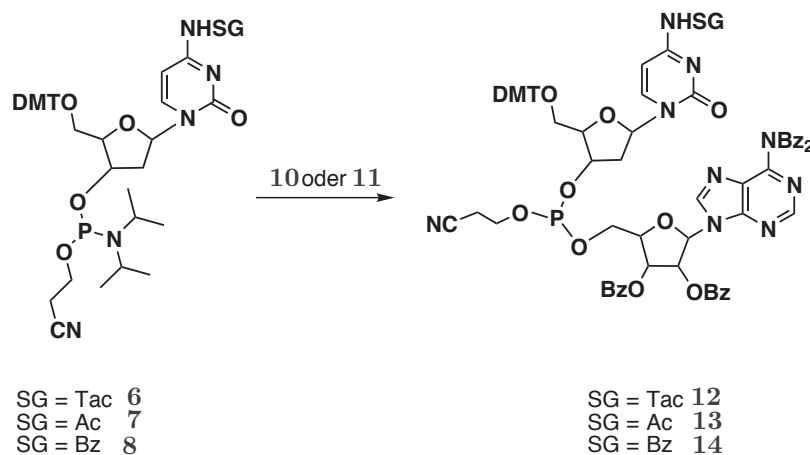
Für die Kopplung müssen die Phosphoramidite zunächst durch eine schwache Säure aktiviert werden. Robertson *et al.* [30] hatte zur Aktivierung des Phosphoramidits Tetrazol (**9**) verwendet. Dabei wird die Aminogruppe zunächst durch das Tetrazol (**9**) protoniert. Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff auf das Phosphoratom, wobei ein Tetrazolid entsteht und die Aminogruppe abgespalten wird.



Schema 3.4: Die Kopplungsreagenzien Tetrazol (**9**), Aktivator 42 (**10**) und Benzylmercaptotetrazol (**11**).

Für die Kopplung wurden im Arbeitskreis die in Schema 3.4 gezeigten Tetrazolderivate verwendet, da sie im Gegensatz zu Tetrazol (**9**) leichter zu handhaben sind. Die

Tetrazolderivate Aktivator 42 (A42, **10**) und Benzylmercaptotetrazol (BMT, **11**) wurden jeweils in 5 ml Ansätzen mit den käuflich erworbenen Cytidinen CTac (**6**), CAc (**7**), CBz (**8**) und das benzoylgeschützte Adenosin **5** umgesetzt (Schema 3.5). Die Reaktionsansätze wurden 16 h bei Raumtemperatur gerührt.



Schema 3.5: Synthese von unterschiedlich geschützten Kopplungsprodukten unter Einsatz von Aktivator 42 (**10**) und Benzylmercaptotetrazol (**11**).

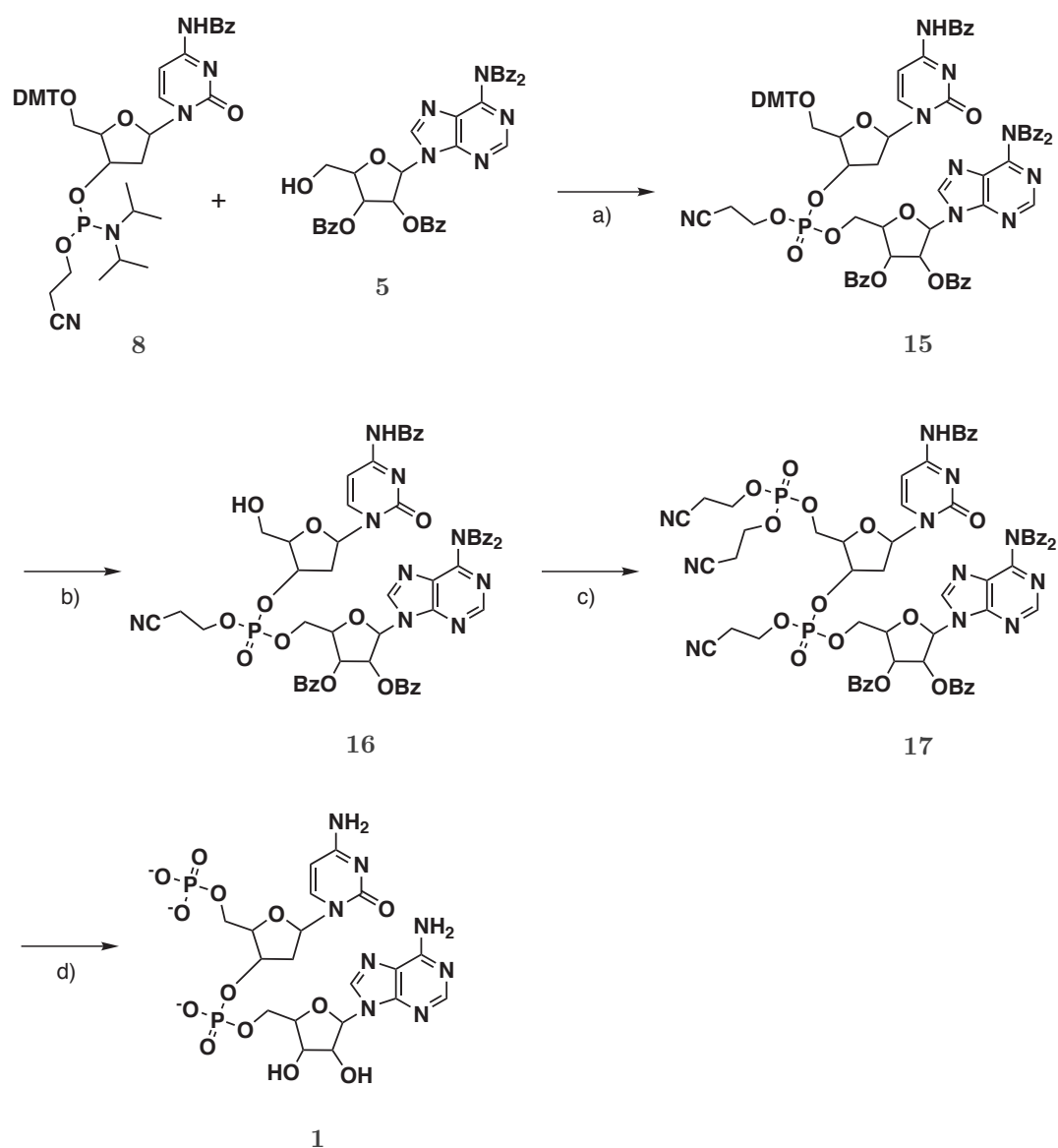
Von den Reaktionsgemischen wurden ESI-Massenspektren aufgenommen um die Produktbildung zu kontrollieren (Tabelle 3.1). Eine Umsetzung der unterschiedlich geschützten Cytidine mit Aktivator 42 (**10**) zum gewünschten Produkt konnte in den ESI-Massenspektren nicht beobachtet werden. Eine Umsetzung zum gewünschten Kopplungsprodukt konnte nur bei CAc (**7**) und CBz (**8**) mit Benzylmercaptotetrazol (**11**) als Kopplungsreagenz beobachtet werden.

Tabelle 3.1: Synthese der unterschiedlich geschützten Kopplungsprodukte. Analyse des Reaktionsgemisches mittels ESI-MS Messungen.

	CTac (6)	CAc (7)	CBz (8)
Aktivator 42 (10)	n. d.	n. d.	n. d.
BMT (11)	n. d.	1354 ^[a]	1416 ^[a] , 1439 ^[b]
n. d.: nicht detektiert [a] [M + H] ⁺ [b] [M + Na] ⁺			

Für die Synthese zum Dinukleotid **1** wurde das benzoylgeschützte Cytidin **8** verwendet, da diese Gruppe auch zur Schützung von **5** verwendet wurde und die Benzoylschutzgruppe des Cytidins **8** mit allen anderen Schutzgruppen im letzten Schritt

der Synthese auf einmal abgespalten werden kann. Der weitere Syntheseverlauf zum Dinukleotid **1** ist in Schema 3.6 beschrieben.



Schema 3.6: Synthese von 5'-Phospho-2'-desoxycytidylyl(3'-5')adenosin (**1**).
 a) 5-Benzylmercapto-1*H*-tetrazol (**11**), tr. Acetonitril, 16 h; dann *tert*-Butylhydroperoxid, erst 30 min bei 0 °C, dann 2,5 h bei Raumtemp. b) *p*-Toluolsulfonsäure, DCM/EtOH, 1 h, Raumtemp. c) 5-Benzylmercapto-1*H*-tetrazol (**11**), Bis(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphine, tr. Acetonitril, 16 h, Raumtemp., d) NH₃, Dioxan/Methanol, 3 d, Raumtemp.

Alle Produkte wurden säulenchromatografisch an Kieselgel gereinigt. Da Phosphoramidite schon unter leicht sauren Bedingungen instabil sind, wurde das Kopplungsprodukt aus CBz **8** und **5** ohne weitere Aufreinigung direkt mit *tert*-Butylhydroperoxid zur stabileren Verbindung **15** oxidiert. Nach säulenchromatografischer Reinigung konnte das oxidierte Kopplungsprodukt **15** mit einer Ausbeute von 63 % erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde die Dimethoxytritylgruppe (DMT) sauer mit *p*-Toluolsulfonsäure abgespalten. Nach Säulenchromatographie konnte **16** mit einer Ausbeute von 63 % erhalten werden. Damit die Ligation mit der verkürzten tRNA später erfolgen kann, wurde eine weitere Phosphatgruppe an der 5'-Position der Verbindung **16** benötigt. Dazu wurde **16** mit Bis(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)-phosphin in trockenem Acetonitril bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach 16 h wurde *tert*-Butylhydroperoxid zugegeben und Verbindung **17** konnte nach einer Säulenchromatographie mit einer Ausbeute von 37 % erhalten werden.

Im letzten Schritt wurden die Benzoyl- und β -Cyanoethyl-Schutzgruppen basisch abgespalten. In der Literatur wurden mehrere Wege zur Entschützung beschrieben. Chemama *et al.* [86] hat zur Entschützung dieser Gruppen Methylamin-Lösung im fünffachen Überschuss eingesetzt, wobei der Ansatz 24 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Robertson *et al.* [30] verwendete konzentrierter Ammoniak und erhitze den Ansatz 24 h auf 55 °C in einem geschlossenen, drucksicheren Kolben. In einer weiteren Vorschrift wurde ebenfalls konzentrierter Ammoniak verwendet, allerdings wurde der Ansatz nicht wie bei Robertson erhitzt, sondern bei Raumtemperatur gerührt.

Für die Veresterung, sowie Ligation mit der verkürzten tRNA ist es wichtig, dass alle Schutzgruppen vollständig abgespalten werden. Daher wurden zur Darstellung des Dinukleotids **1** mehrere Entschützungsbedingungen getestet und mittels ESI-MS und NMR untersucht. Eine Entschützung wurde mit Methylamin-Lösung durchgeführt und zwei Ansätze mit 25 % Ammoniaklösung in einem Methanol-Dioxan-Gemisch. Bei der ammoniakalischen Entschützung wurde der eine Ansatz 24 h bei Raumtemperatur gerührt und der andere Ansatz in der Mikrowelle auf 55 °C, 3 h erhitzt. Bei allen Ansätzen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan/Methanol aufgenommen. Das Dinukleotid **1** ist als Ammoniumsalz wasserlöslich, daher wurde eine Extraktion mit Wasser durchgeführt, ähnlich einer Phenol-Chloroform-Extraktion bei einer DNA-Reinigung.

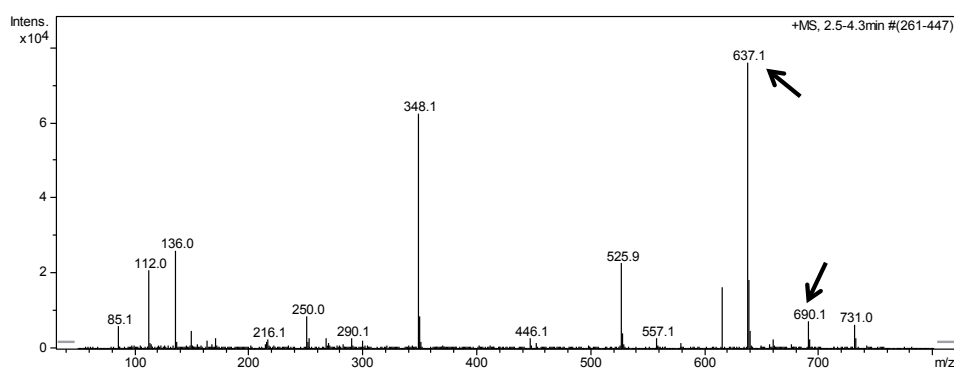


Abbildung 3.1: ESI-Massenspektrum von **1**. Die Entschützung erfolgte mit Ammoniak in der Mikrowelle. Im Spektrum kann man neben dem Molekülpeak bei 637, noch die Masse 690 sehen. Die Masse bei 690 entspricht der unvollständig entschützten Verbindung mit einer β -Cyanoethyl-Gruppe.

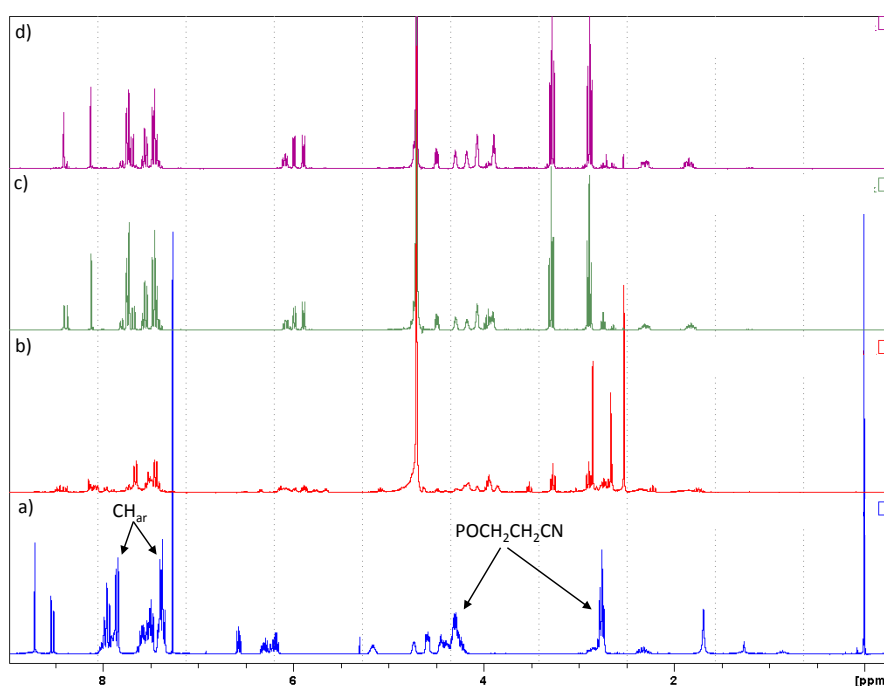


Abbildung 3.2: ¹H-NMR-Spektren vom Dinukleotid **1**, die bei unterschiedlichen Bedingungen entschützt wurden. a) Eingesetztes, noch vollständig geschütztes Edukt **17**. b) Methylamin, 24 h, Raumtemp. c) 25 % Ammoniak in Dioxan/Methanol, 24 h, Raumtemp. d) 25 % Ammoniak in Dioxan/Methanol, 55 °C, 3 h, Mikrowelle.

Von dem isolierten weißen Feststoff wurden zur Identifizierung ESI-Massenspektren, ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen. In allen ESI-Massenspektren konnte der Molekülpeak von 637 beobachtet werden (Abbildung 3.1).

Allerdings wurde ein weiteres Signal bei 690 gefunden, das der Masse von dem Dinukleotid **1** mit einer β -Cyanoethyl-Schutzgruppe entspricht. Eine unvollständige Entschützung konnte mit Hilfe der NMR-Spektren (Abbildung 3.2) nachgewiesen werden. Im Spektrum sind die Signale für die Schutzgruppen bei 2,8, 4,3, 7,4 und 7,8 ppm noch in allen Spektren zu sehen.

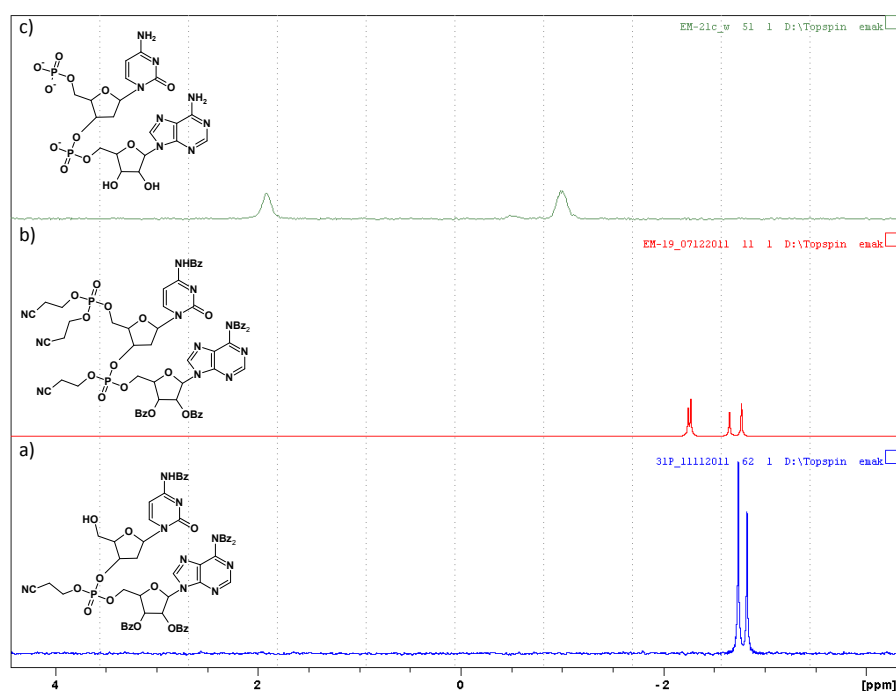


Abbildung 3.3: Vergleich der ^{31}P -NMR-Spektren von den Edukten a) [N^4 -Benzoyl-2'-desoxycytidyl]-(3',5')- β -cyanoethyl)-phosphatidyl- [$N^6,N^6,2',3'$ -O-tetrabenzoyladenosen] (**16**), b) [N^4 -Benzoyl-5'-O-(di- β -cyanoethylphosphin)-2'-desoxycytidyl]-(3',5')- β -cyanoethyl)-phosphatidyl- [$N^6,N^6,2',3'$ -O-tetrabenzoyladenosen] (**17**), c) entschütztes Dinukleotid **1**.

Mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektren konnte die Entschützung der Phosphatgruppe vom Dinukleotid **1** ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Durch die Abspaltung der β -Cyanoethyl-Gruppe werden die Signale der Phosphoratome in Richtung Tieffeld verschoben. Das Dinukleotid **1** wird als Ammoniumsalz erhalten und ist wasserlöslich. Die Veresterung mit der unnatürlichen Aminosäure erfolgt später in

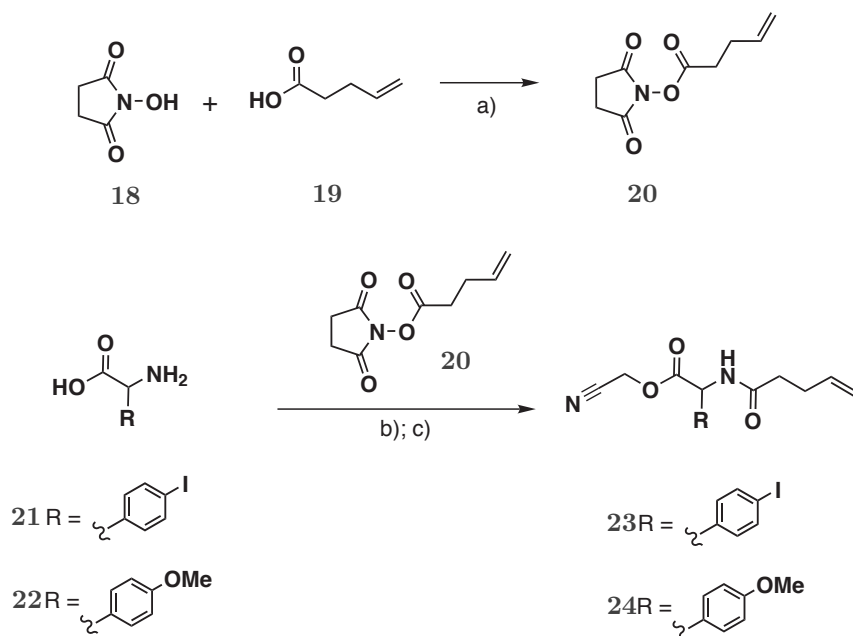
N,N-Dimethylformamid (DMF). Um die Löslichkeit des Dinukleotids **1** in DMF zu erhöhen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Dabei wurde das Ammonium gegen Tetrabutylammonium ausgetauscht. Der Austausch konnte mit ESI-MS und ¹H-NMR bestätigt werden.

3.1.2 Aktivieren und Schützen der unnatürlichen Aminosäure

Die unnatürlichen Aminosäuren 4-Iod-L-phenylalanin (**18**) und 4-Methoxy-L-phenylalanin (**19**) sollen in GFP eingebaut werden und die natürliche Aminosäure Tyrosin an der 66. Position ersetzen. Der Einbau ins GFP kann dann über die Fluoreszenzänderung kontrolliert werden, wie durch Wang *et al.* [87] beschrieben.

Die unnatürliche Aminosäure wird über eine Esterbindung an die 2'- oder 3'-OH-Gruppe des Dinukleotids **1** geknüpft. Für diese Verknüpfung musste zunächst die Aminogruppe geschützt und die Carboxylgruppe aktiviert werden. Die Schützung und Aktivierung der unnatürlichen Aminosäure erfolgte in einem Schritt und wurde analog einer Vorschrift von Lodder *et al.* [88] durchgeführt. Die Aminogruppe wurde mit der Pentenoylgruppe geschützt und die Carboxylgruppe mit Chloracetonitril aktiviert. Die Schutzgruppe wurde mit 4-Pentenoyloxysuccinimid (**20**), das zuvor synthetisiert wurde, übertragen (Schema 3.7). Zur Synthese von **20** wurde *N*-Hydroxysuccinimid (**21**) mit 4-Pentensäure (**22**) in Gegenwart von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) umgesetzt. DCC ist ein Kupplungsreagenz und bildet mit 4-Pentensäure (**22**) einen Aktivester. Nach der Säulenchromatographie konnte 4-Pentenoyloxysuccinimid (**20**) in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 60 % erhalten werden.

Die Synthese zum Aktivieren und Schützen der beiden Aminosäuren 4-Iod-L-phenylalanin (**18**) und 4-Methoxy-L-Phenylalanin (**19**) ist in Schema 3.7 dargestellt. Nach der Umsetzung mit 4-Pentenoyloxysuccinimid (**20**) wurden die Zwischenprodukte ohne weitere Reinigung direkt mit Chloracetonitril in Acetonitril und Triethylamin behandelt. Beide Produkte **24** und **23** wurden mittels Säulenchromatographie gereinigt und eine Ausbeute von 60 - 80 % konnte erzielt werden.



Schema 3.7: Schützen und Aktivieren der unnatürlichen Aminosäuren **24** und **23**. a) DCC, Dichlormethan, 1,5 h Raumtemp. b) NaHCO₃, H₂O/Dioxan, 16 h Raumtemp. c) Chloracetonitril, NEt₃, Acetonitril, 20 h Raumtemp.

3.1.3 HPLC Analytik

Der Fortschritt der Veresterung des Dinukleotids **1** mit einer unnatürlichen Aminosäure kann mit Hilfe der reversen analytischen HPLC kontrolliert werden. In der Literatur [88] wurde ein Fließmittel aus 1 - 63 % Acetonitril und Ammoniumacetat (50 mM, pH 4,5) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde das Dinukleotid **1** zuerst eluiert und die aktivierte Aminosäure erst nach etwa 40 min detektiert. Das Signal für das acylierte Dinukleotid erscheint typischerweise zwischen dem Dinukleotid und der aktivierten Aminosäure. Der Reaktionsfortschritt für die Acylierung des Dinukleotids pdCpA sollte im Labor ebenfalls mit Hilfe der reversen analytischen HPLC kontrolliert werden. Dafür wurde in Anlehnung an Lodder *et al.* [88] eine Methode für die *Waters Breeze* HPLC Anlage entwickelt. Die genauen Daten der Anlage und der verwendeten Säule sind in Abschnitt 7.2.2 beschrieben. Mit einer Oligonukleotidsynthesemaschine wurde zunächst ein Standard hergestellt. Die Retentionszeit des Standards wurde mit dem im Labor synthetisierten pdCpA verglichen. Die Retentionszeit des synthetisierten Produkts lag bei $t = 3,784$ min und entspricht der Retentionszeit vom Standard. In den beiden Chromatogrammen (Abbildung 3.4) kann man neben den Produktsignal noch einen weiteren Peak zwischen

6 und 7 min erkennen, dies auf eine Verunreinigung hindeutet. Von der reinen unnatürlichen Aminosäure **24** wurde ebenfalls ein Chromatogramm aufgenommen, die Retentionszeit betrug $t = 11,485$ min (Chromatogramm nicht gezeigt). Die hier verwendete Fließmittelzusammensetzung konnte nicht zur Kontrolle des Reaktionsfortschritts verwendet werden, da das pdCpA mit dem acetylierten Produkt zusammen eluiert werden würde und eine Auswertung nicht möglich wäre. Daher wurde die Fließmittelzusammensetzung dahingehend verändert, sodass das pdCpA immer noch bei etwa 3 min eluiert wird und die unnatürliche Aminosäure erst nach etwa 33 min.

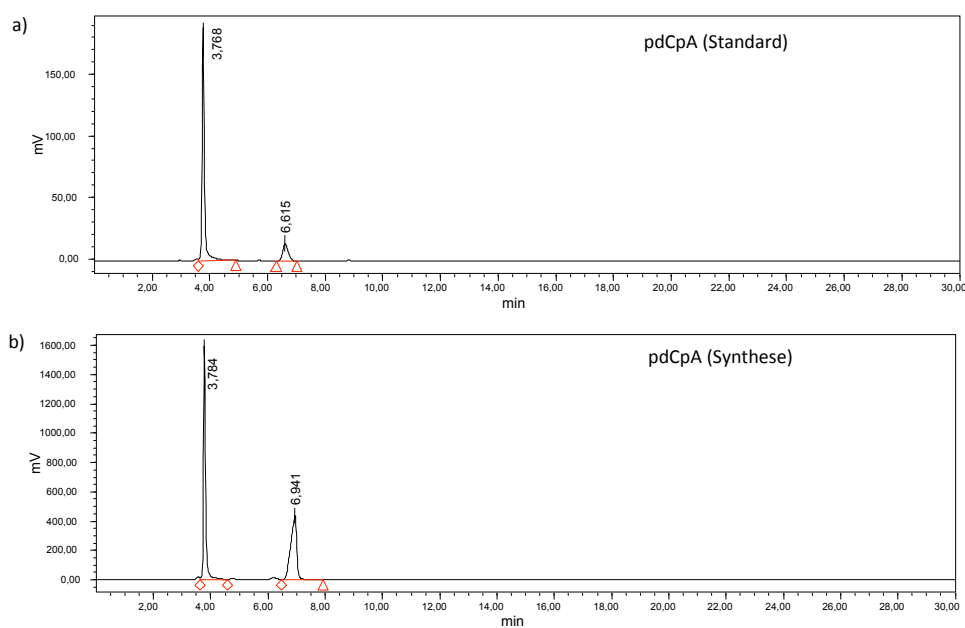
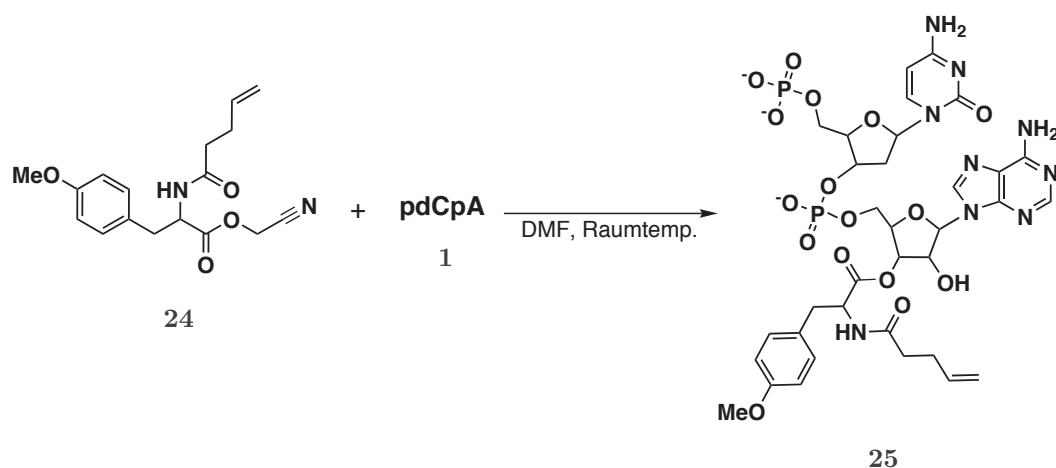


Abbildung 3.4: Vergleich der Chromatogramme von pdCpA **1** a) als Standard aus Oligonukleotidsynthesemaschine und b) aus Synthese.

Die Veresterung wurde mit dem Dinukleotid **1** und der unnatürlichen Aminosäure **24** analog einer Vorschrift von Lodder *et al.* [88] durchgeführt (Schema 3.8). Die Aminosäure **24** wurde im fünffachen Überschuss eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in trockenem DMF und wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 5 h wurde die erste Probe entnommen, mit Ammoniumacetat versetzt und in die HPLC eingespritzt. Das Chromatogramm der unnatürlichen Aminosäure mit dem neuen Fließmittel ist in Abbildung 3.5 a) gezeigt, die Retentionszeit der unnatürlichen Aminosäure betrug $t = 33,471$ min. In Abbildung 3.5 b) ist ein Chromatogramm der Reaktion vom Dinukleotid mit der aktivierten Aminosäure nach 5 h Reakti-



Schema 3.8: Veresterung der unnatürlichen Aminosäure *N*-4-Pentenyl-*p*-Methoxy-L-phenylalanin-cyanomethylester (**24**) mit pdCpA **1**.

onszeit dargestellt. Neben den beiden Eduktpeaks pdCpA **1** ($t = 3,438$ min) und die unnatürliche Aminosäure ($t = 33,376$ min) sind noch zwei weitere Signale bei $t = 22,005$ min und $t = 27,496$ min mit höherer Intensität neu dazugekommen. Eine Umsetzung konnte nach dem Chromatogramm beobachtet werden, allerdings ist nicht wie in der Literatur beschrieben, nur ein Produkt entstanden.

3.1.4 Synthese der verkürzten tRNA

Die verkürzte tRNA wurde mit Hilfe der *run off*-Transkription analog der Vorschriften von Sampson *et al.* [89] und Saks *et al.* [90] hergestellt. Zur Darstellung der tRNA-(CA) ist es wichtig, dass sich in der Sequenz ein T7-Promotor befindet, an der T7-RNA-Polymerase binden kann. Zusätzlich muss sie eine tRNA mit einem *amber* Stopcodon TAG als Anticodon kodieren, sowie die Schnittstelle für das Enzym *FokI* enthalten. Das Enzym *FokI* ist ein Restriktionsenzym, das nicht direkt an der Erkennungssequenz schneidet, sondern am 5' nach 3' Strang 9 Basenpaare und am komplementären Strang 13 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt. Dadurch kann genau an einer Stelle in der tRNA-Sequenz geschnitten werden, sodass nach der Transkription am Ende das Dinukleotid aus Cytidin und Adenosin fehlen (Abbildung 3.6). Die tRNA-Sequenz befand sich im pBluescript II SK (-) und war schon im Arbeitskreis vorhanden, sodass nur noch die Sequenz überprüft werden musste. Die Sequenzierung des Konstruktes ergab, dass sich zwei T7-Promotoren

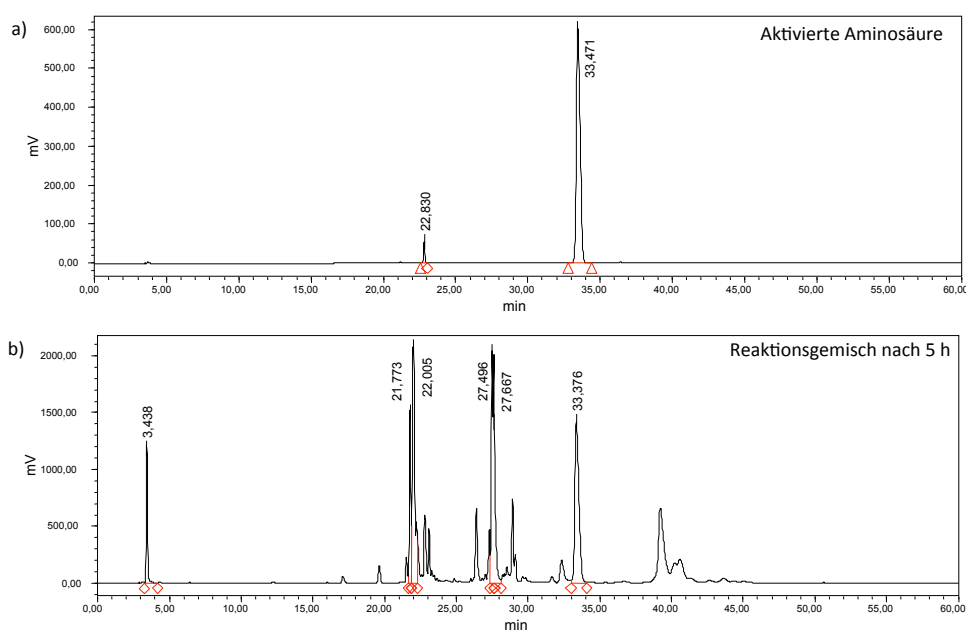


Abbildung 3.5: HPLC-Chromatogramm von a) dem Edukt *N*-4-Pentenoyl-*p*-methoxy-*L*-phenylalanin-cyanomethylester (**24**) und b) dem Reaktionsgemisch der Synthese in Schema 3.8 nach 5 h.

im Konstrukt befanden und somit unterschiedlich große *tRNA*-(CA) entstehen würden, sollte diese für die verkürzte *tRNA* Synthese eingesetzt werden. Daher wurde die *tRNA* in den pUC18-Vektor kloniert. Der pUC18-Vektor und das sich im pBluescript II SK (-) befindende *tRNA*-Konstrukt wurden jeweils mit den Enzymen *Bam*HI und *Hin*DIII verdaut. Nach Reinigung des geschnittenen Vektors und *tRNA*-*inserts* aus dem Agarosegel erfolgte der Ligationschritt, wie im Abschnitt 7.1.9 beschrieben wurde. Die Sequenzierung des *tRNA*-pUC18-Konstruktes ergab eine Übereinstimmung mit der Originalsequenz.

Die Synthese der verkürzten *tRNA*, bei dem die Basen Cytidin und Adenosin fehlen, ist in Abschnitt 7.1.10 beschrieben. Zunächst wurde das *tRNA*-pUC18-Konstrukt mit dem Enzym *Fok*I linearisiert. Das Konstrukt besitzt sechs *Fok*I Schnittstellen und bei einem vollständigen Verdau werden sechs DNA Fragmente mit den Größen: 168, 181, 244, 287, 642 und 1285 bp erhalten, wobei die Bande bei 168 bp das *tRNA*-*insert* enthält. Damit keine unterschiedlich großen *tRNAs* entstehen, ist es wichtig, dass die Linearisierung vollständig verlief. Die Linearisierung wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Es ist anzumerken, dass die Proben, bevor sie aufs Gel aufgetragen wurden, mit SDS versetzt und 5 min bei 65 °C inkubiert werden

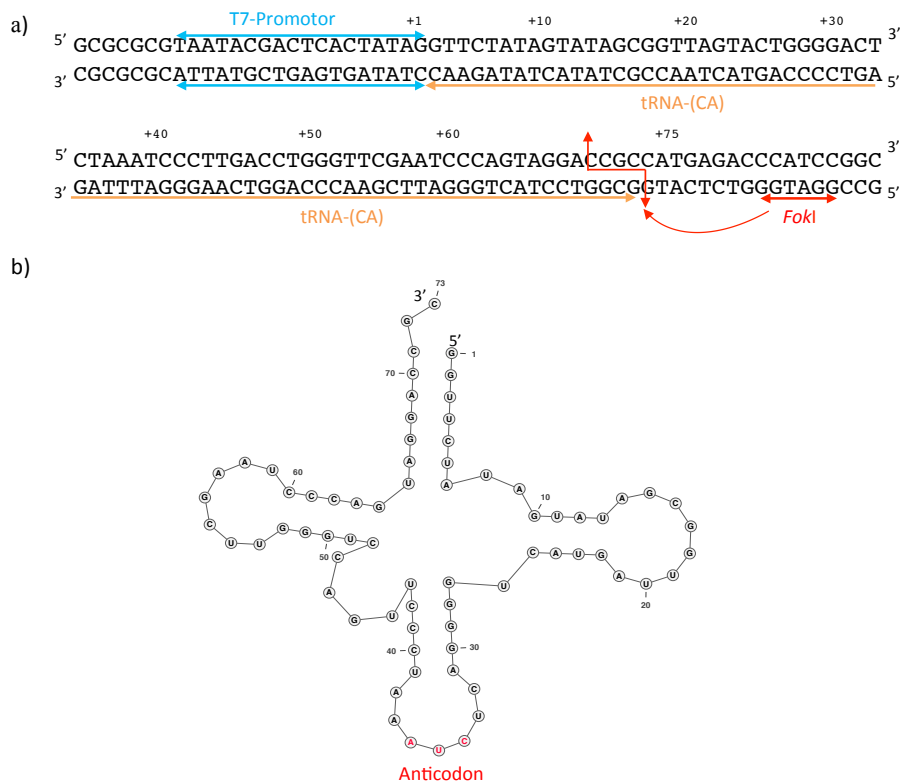


Abbildung 3.6: Darstellung der *run off*-Transkription. a) Sequenz der *tRNA* mit dem T7-Promotor und der Erkennungssequenz des Enzyms *FokI*. Der rote Pfeil deutet die Schnittstelle des Enzyms an. b) Sequenz der *tRNA*-(CA), welches nach der *run off* Transkription der mit *FokI* linearisierten DNA erhalten wird.

mussten, damit das Enzym inaktiviert wurde und die DNA freigab. Ohne diesen Schritt wurde keine Auftrennung der DNA-Fragmente beobachtet (Abbildung 3.7). Nach Fällung der geschnittenen DNA erfolgte die Transkription mit der T7-RNA-Polymerase, sowie die Reinigung und Größenbestimmung der hergestellten *tRNA*-(CA) wie in Abschnitt 7.1.10 beschrieben wurde. Die gefällte RNA wurde auf ein Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach ihrer Größe aufgetrennt. In Abbildung 3.8 (linkes Bild) ist ein Harnstoff-Polyacrylamidgel dargestellt. Diese Bande wurde aus dem Gel geschnitten und die RNA daraus isoliert. Die isolierte RNA wurde mit einem MOPS-Formaldehyd-Agarosegel auf ihre Qualität hin überprüft (Abbildung 3.8, rechtes Bild). Im Gel ist eine Bande zwischen 50 und 80 Basen zu erkennen.

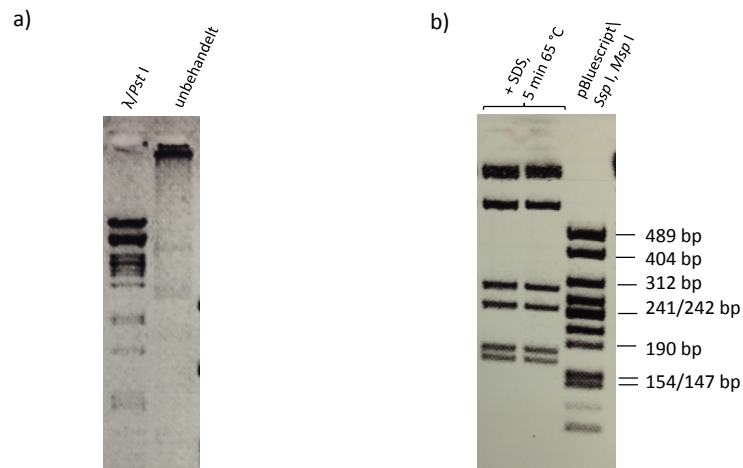


Abbildung 3.7: Kontrolle der vollständigen Linearisierung mittels Agarosegelelektrophorese. a) 2% Agarosegel mit unbehandelter Probe. b) 3% *Low Melt* Agarosegel mit behandelter Probe.

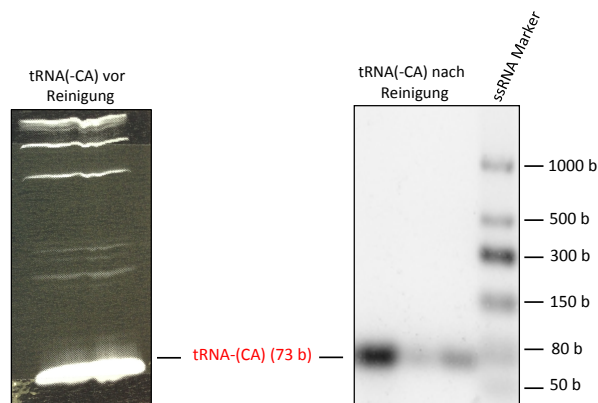


Abbildung 3.8: Bestimmung der Bandengröße. Links: 6% Harnstoff-Polyacrylamidgel zur Reinigung der tRNA(-CA), Rechts: 2% MOPS-Formaldehyd-Gel mit der gereinigten tRNA(-CA). Die genaue Größe der Bande wurde mit der LUMIANALYST Software bestimmt und betrug 73 b.

Die genaue Größe der Bande wurde mit der LUMIANALYST Software bestimmt und betrug 73 Basen, welches der erwarteten Größe der tRNA(-CA) entspricht. Die Ligation der tRNA(-CA) mit dem Dinukleotid 1 wurde nicht durchgeführt, weil zu dem

Zeitpunkt die Priorität auf die Synthesen der Pentamidin-Analoga gesetzt wurde.

3.2 Zellfreie Synthese mit Amphipolen

Im Arbeitskreis wird bei der Herstellung von Membranproteinen zunächst ein Detergenzien *Screen* im analytischen Maßstab durchgeführt. Damit kann untersucht werden, in welchen Detergenzien die höchste Ausbeute an richtig gefalteten Protein entsteht. Um das Repertoire an Detergenzien oder Substanzen, die mit dem zellfreien System kompatibel sind zu erweitern, sollten kommerziell erhältliche Amphipole getestet werden. Die kommerziell erhältlichen Amphipole, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Ausser A8-35, welches ein anionisches Amphipol ist, haben die anderen Amphipole allesamt eine zwitterionische Struktur.

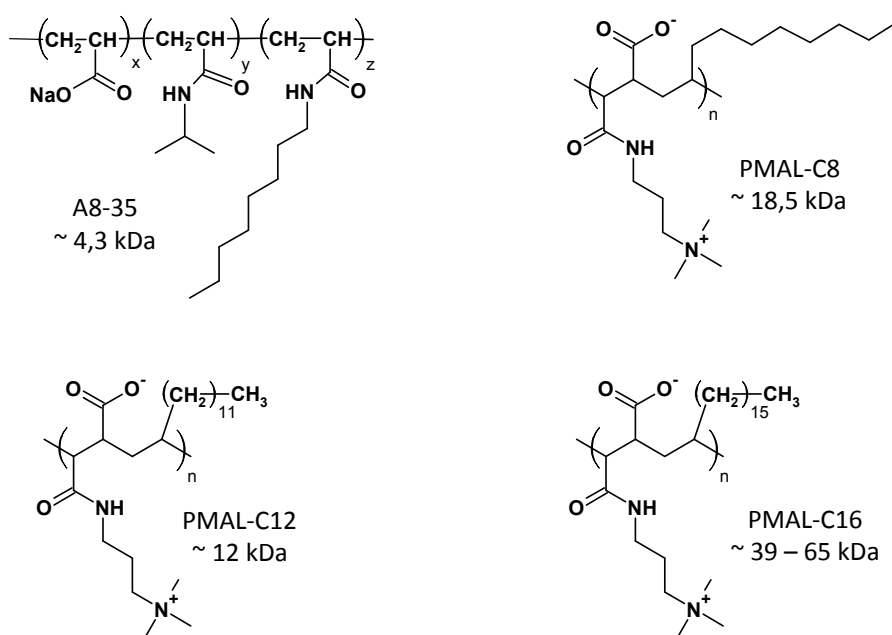


Abbildung 3.9: Struktur der kommerziell erhältlichen Amphipole, die in der zellfreien Proteinsynthese getestet wurden.

3.2.1 Untersuchungen von Amphipolen in der analytischen zellfreien Synthese

Die in Abbildung 3.9 dargestellten Amphipole wurden teilweise schon in der zellfreien Proteinsynthese eingesetzt. Park *et al.* [91] hatte A8-35 für die zellfreie Synthese von mehreren Transmembranproteinen, sowie für das lösliche Protein GFP, verwendet. Es hat sich herausgestellt, dass das lösliche Protein GFP hergestellt wird, allerdings nicht alle getesteten Transmembranproteine. Scheinbar wird der Transkriptions-/Translationsvorgang von Membranproteinen teilweise inhibiert. Zur Faltungskontrolle sind die in dieser Arbeit getesteten Proteine alle am C-terminalen Ende mit GFP fusioniert. In-Gel-Fluoreszenz Messungen geben Auskunft darüber, ob das GFP richtig gefaltet ist und Fluoreszenz zeigt. Zeigt das GFP Fluoreszenz, kann davon ausgegangen werden, dass das fusionierte Protein ebenfalls richtig gefaltet und funktionell ist [46]. Um zu testen, ob die Amphipole in Abbildung 3.9 allgemein den Transkription-/Translationsvorgang stören, wurde zunächst nur das lösliche GFP zellfrei hergestellt. In Anlehnung an die Publikationen von Klammt *et al.* [92] und Bazzacco *et al.* [93] wurden die Amphipole in den Konzentration von 0,5 mg/mL und 2,0 mg/mL und das Brij78 in der Konzentration von 0,8 % eingesetzt [46]. In Abbildung 3.10 A sind die In-Gel-Fluoreszenz Messungen und die dazugehörigen Western Blots dargestellt. Das Amphipol A8-35 scheint die zellfreie Synthese zu inhibieren. Weder bei einer hohen noch bei einer niedrigen Konzentration von A8-35 kann GFP nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu A8-35 kann bei einer niedrigen Konzentration an PMAL überall fluoreszierendes GFP hergestellt werden. Nur bei der höheren Konzentration von 2,0 mg/mL wird die zellfreie Synthese auch bei PMAL-C12 und PMAL-C16 inhibiert. Dass eine höhere Konzentration an PMAL-C12 die zellfreie Synthese inhibiert, war schon bekannt [92] und konnte in diesem Versuch reproduziert werden. Dieses Phänomen kann nicht auf alle Amphipole der PMAL-Familie übertragen werden. Während PMAL-C16 die zellfreie Synthese inhibiert, ist eine höhere Konzentration an PMAL-C8 noch tolerierbar. Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten, so ist sie bei PMAL-C8 vergleichbar mit Brij78, welches in den bisherigen Proteinsynthesen im Arbeitskreis am häufigsten die besten Ergebnisse brachten. Im Vergleich zu der Synthese bei dem gar keine Zusätze in den Ansatz kamen, ist die Fluoreszenzintensität bei Brij78 und PMAL-C8 20 % geringer. Der Antikörper, der für die Western Blots verwendet wurde, ist gegen GFP gerichtet. Dort wo Fluoreszenz im SDS-Page zu sehen war, wurde auch eine Bande bei

24 kDa beobachtet (Abbildung 3.10). Auffällig ist die zweite Bande bei 33 kDa in den Western Blots. Sie ist auch zu beobachten, wenn kein Detergenz oder Amphipol eingesetzt wurde. Auch zeigt sie keine Fluoreszenz. Es ist bekannt, dass dasselbe Protein unterschiedliche Laufhöhen besitzen kann, je nachdem ob das Protein korrekt gefaltet ist oder nicht [94]. Daher stammt die zweite Bande vermutlich vom falsch gefalteten Protein, sie zeigte keine Fluoreszenz.

Rezeptoren oder auch Enzyme wurden in der zellfreien Synthese mit den Amphipolen A8-35 und PMAL-C12 schon hergestellt [91, 92], aber die zellfreie Synthese von Proteinen, die die Funktion eines Kanals oder Transporters aufweisen, ist nicht bekannt. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit auch unterschiedliche Kanalproteine untersucht werden.

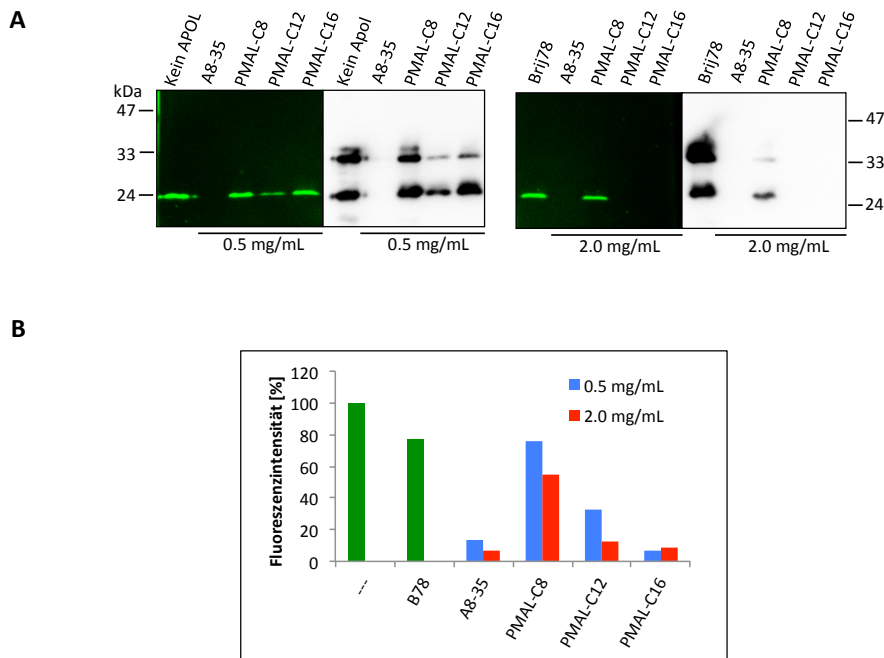


Abbildung 3.10: **A:** GFP Amphipol *Screen*. Dargestellt sind SDS-Gele (links) mit den dazugehörigen Western Blots (rechts). Der verwendete Antikörper ist gegen GFP gerichtet (anti-GFP (FL)). **B:** Vergleich der In-Gel Fluoreszenzintensitäten. Die Fluoreszenzintensität ist in [%] angegeben. Die Probe mit der höchsten Intensität wurde 100 % gesetzt und alle anderen Proben darauf bezogen. Die grünen Balken repräsentieren die Intensitäten der Proben ohne Detergenz (-) und mit Brij78 (0,8 %). Die Amphipole wurden in zwei Konzentrationen eingesetzt: 0,5 mg/mL (blaue Balken) und 2 mg/mL (rote Balken).

Zunächst wurden die Amphipole A8-35 und PMAL-C8 an der zellfreien Synthese von dem im Arbeitskreis gut untersuchten Protein PfAQP-GFP (Aquaporin aus *Plasmodium falciparum*) getestet und mit dem Detergenz Brij78 verglichen. Obwohl A8-35 in dem Vorversuch mit GFP die zellfreie Synthese anscheinend behindert, sollte diese trotzdem nochmal in unterschiedlichen Konzentrationen getestet werden. Aus dem Vorversuch mit GFP konnte festgestellt werden, dass PMAL-C8 bis zu einer Konzentration von 2,0 mg/mL eingesetzt werden kann, daher wurden vier Konzentrationen von 0,5 - 2,0 mg/mL für die beiden Amphipole A8-35 und PMAL-C8 gewählt. In der Abbildung 3.11 A sind die In-Gel-Fluoreszenz Messungen und die dazugehörigen Western Blots von PfAQP-GFP dargestellt. Betrachtet man nur die In-Gel Fluoreszenz, fällt auf, dass bei Brij78 eine fluoreszierende Bande bei 47 kDa auftaucht, die der Größe des PfAQP-GFPs entspricht, es aber bei A8-35 bei keiner Konzentration (Abbildung 3.11 A) der Fall war. Nur bei einer Konzentration von 1 mg/mL kann eine sehr schwache fluoreszierende Bande bei etwa 24 kDa beobachtet werden, die vermutlich ein Spaltprodukt des Fusionsproteins darstellt.

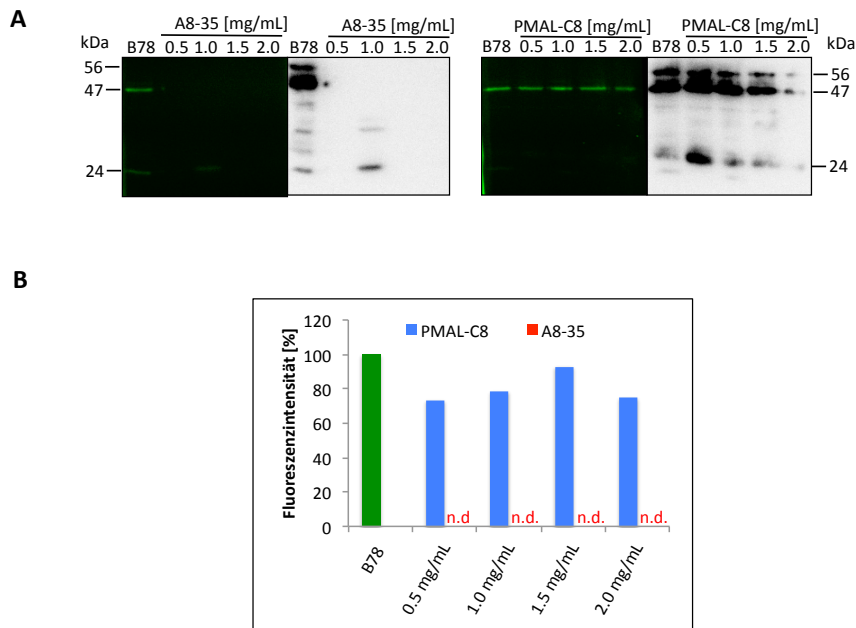


Abbildung 3.11: **A**: Zellfreie Synthese von *Pf*AQP-GFP mit den Amphipolen A8-35 (links) und PMAL-C8 (rechts) in unterschiedlichen Konzentrationen. Der verwendete Antikörper in den Western Blots ist gegen GFP gerichtet (anti-GFP (FL)). **B**: Vergleich der In-Gel Fluoreszenzintensitäten. Die Fluoreszenzintensitäten sind in [%] angegeben. Die Probe mit der höchsten Intensität wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Proben darauf bezogen. Die eingesetzte Konzentration von Brij78 betrug 0,8 % (grüner Balken). Die blauen und roten Balken repräsentieren die Proben mit PMAL-C8 und A8-35 in unterschiedlichen Konzentrationen. n. d. = nicht detektiert.

Der verwendete Antikörper im dazugehörigen Western Blot ist gegen das GFP gerichtet. Im Western Blot kann eine starke Produktion von dem Fusionsprotein PfAQP-GFP bei Brij78 beobachtet werden. PfAQP-GFP taucht im Western Blot als Doppelbande auf, die einmal das richtig gefaltete (untere Bande, 47 kDa) und einmal das falsch gefaltete Protein (obere Bande, 56 kDa) darstellen. Im Vergleich zu Brij78 kann bei A8-35 weder eine Produktion vom richtig gefaltetem noch vom falsch gefaltetem Fusionsprotein nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu A8-35 kann bei PMAL-C8 bei allen eingesetzten Konzentration eine fluoreszierende Bande bei etwa 47 kDa (Abbildung 3.11 A) beobachtet werden. Die Fluoreszenz- und die Bandenintensität im Western Blot vom Fusionsprotein, hergestellt in Brij 78 und in PMAL-C8, wurden mit der Software LUMIANALYST

miteinander verglichen. Sie ergab, dass sowohl die Fluoreszenzintensitäten als auch die Bandenintensität des in PMAL-C8 hergestellten Proteins bis zu 25 % geringer ist (Abbildung 3.11 B). Daraus kann geschlossen werden, dass das Protein auch mit PMAL-C8 hergestellt werden kann, allerdings ist geringer. Anschließend wurden PMAL-C12 und PMAL-C16 ebenfalls in einer zellfreien Synthese von *PfAQP*-GFP in den Konzentrationen 0,5 - 2,0 mg/mL eingesetzt. Es konnte keine Produktion vom Fusionsprotein nachgewiesen werden (SDS-PAGE für die In-Gel Fluoreszenz Messung und Western Blots sind nicht dargestellt).

3.2.2 Analytische zellfreie Synthese von unterschiedlichen Kanalproteinen in PMAL-C8

Wie in Kapitel 3.2.1 dargestellt, kann unter den vier getesteten Amphipolen nur PMAL-C8 in einer höheren Konzentration eingesetzt werden und auch nur in PMAL-C8 konnte *PfAQP*-GFP hergestellt werden. Nun müssen zwei weitere Fragen geklärt werden:

1. Können neben dem Aquaporin aus *Plasmodium falciparum* auch andere membranständige Kanalproteine in PMAL-C8 hergestellt werden?
2. Ist die Ausbeute an richtig gefaltetem Protein generell schlechter als mit einem Standarddetergenz aus der Brij-Familie in der zellfreien Synthese?

Zur Klärung der Fragen wurden folgende Proteine mit GFP fusioniert und zellfrei hergestellt: der Formiat-Transporter aus *Escherichia coli* (*ecFokA*-GFP), der Harnstoff-Transporter B aus der Ratte (*rUT*-B-GFP) und der M2-Kanal aus Influenza Virus A (M2-GFP). In Anlehnung an die Publikation von Müller-Lucks *et al.* [46] wurden M2-GFP und *rUT*-B-GFP in Brij78 und *ecFokA* in Brij58 hergestellt und mit PMAL-C8 verglichen. In Abbildung 3.12 A sind die In-Gel-Fluoreszenz-Messungen und die dazugehörigen Western Blots der hergestellten Proteine *ecFokA*-GFP, *rUT*-B-GFP und M2-GFP dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass alle drei unterschiedlichen Proteine in PMAL-C8 hergestellt werden konnten. Damit konnte die erste Frage, ob neben *PfAQP* auch andere Membranproteine hergestellt werden können, bejaht werden. Wenn man die Western Blots näher betrachtet, fällt auf, dass die getesteten Proteine alle als Doppelbande auftreten. Bei *ecFokA*-GFP fällt auf, dass die Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration an PMAL-C8 zunimmt.

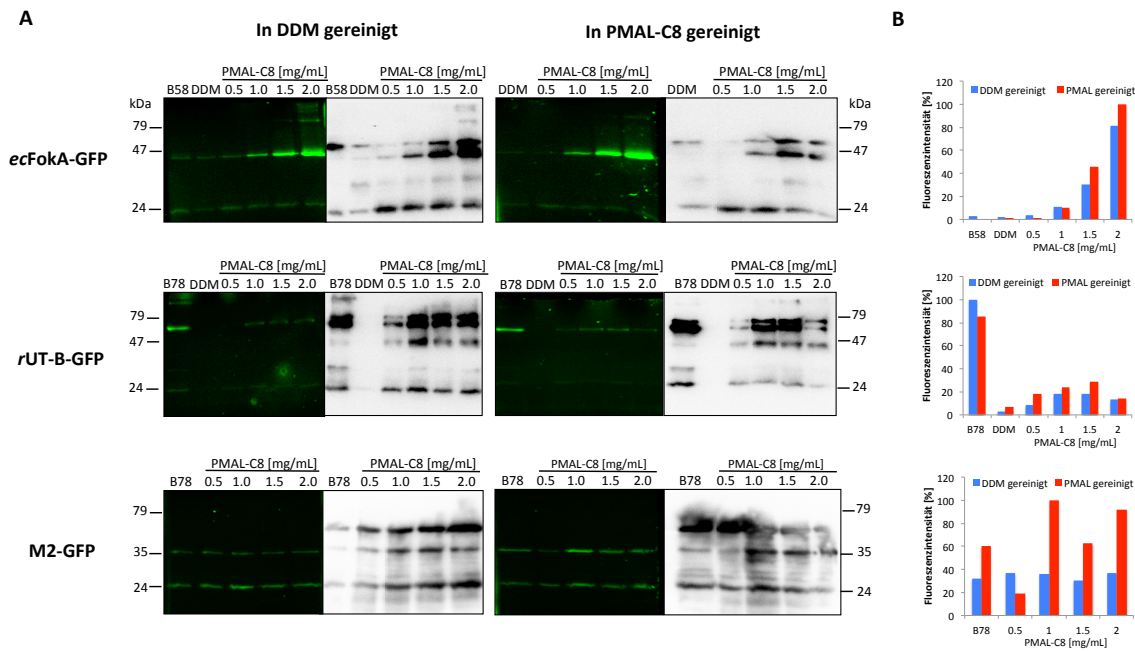


Abbildung 3.12: Zellfreie Synthese von unterschiedlichen Membranproteinen.

A: Links: His-tag Reinigung erfolgte mit einem Reinigungspuffer in dem 0,5% *N*-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) enthalten ist. Rechts: His-tag Reinigung erfolgte mit einem Reinigungspuffer in dem 1 mg/mL PMAL-C8 enthalten ist. Der verwendete Antikörper in allen Western Blots ist gegen GFP gerichtet (anti-GFP(FL)). **B:** Vergleich der In-Gel Fluoreszenzintensitäten: Die blauen Balken repräsentieren die Intensitäten der DDM gereinigten Proben und die roten Balken die PMAL-C8 gereinigten. Die Fluoreszenzintensität ist in [%] angegeben. Als 100% wurde jeweils die Probe mit der höchsten gemessenen Intensität gesetzt und alle anderen Proben darauf bezogen.

Vergleicht man die Fluoreszenzintensität zwischen Brij58 und PMAL-C8 (2 mg/mL), so ist die Fluoreszenzintensität des in PMAL-C8 hergestellten *ecFokA-GFP* 100× höher. Bei den Proteinen *rUT-B-GFP* und *M2-GFP* ist keine Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration an PMAL-C8 zu sehen. Während bei *rUT-B-GFP* die Ausbeute an richtig gefaltetem Protein bei dem Standarddetergenz Brij78 5× höher ist als in PMAL-C8, so scheint es keinen Unterschied in der Ausbeute an richtig gefaltetem Protein bei *M2-GFP* zu geben. Die zweite Frage, ob die Ausbeute an richtig gefaltetem Protein generell schlechter ist, wenn PMAL-C8 in der zellfreien Synthese eingesetzt wird, kann verneint werden. Vermutlich ist es von der Struktur des Proteins oder vom Protein selber abhängig.

Generell wurden die zellfrei hergestellten Proteine einer His-*tag* Reinigung unterzogen (Kapitel 7.1.11). Die His-*tag* Reinigung erfolgte standardmäßig in einem Reinigungspuffer der das Detergenz DDM enthielt. Um eine weitere Frage zu beantworten, ob Amphipole generell die His-*tag* Reinigung stören könnten oder ob sie einen Einfluss auf die sowohl richtig als auch auf die falsch gefalteten Proteine haben könnten, wurden die Proben geteilt und unterschiedlich gereinigt. Die eine Hälfte wurde standardgemäß mit DDM im Reinigungspuffer gereinigt und die andere Hälfte mit einem Reinigungspuffer der anstatt DDM, 1 mg/mL PMAL-C8 enthielt, gereinigt (Abbildung 3.12, links: His-*tag* Reinigung mit DDM, rechts: His-*tag* Reinigung mit PMAL-C8). Schaut man sich die Western Blots der unterschiedlichen Proteine an, so kann keine Störung der His-*tag* Reinigung durch PMAL-C8 festgestellt werden. Auch scheint PMAL-C8 keinen Einfluss auf das Verhältnis zwischen falsch und richtig gefaltetem Protein zu nehmen.

3.2.3 Präparative zellfreie Synthese von M2-Kanal mit PMAL-C8

Der nächste Schritt war die Funktionstestung der in PMAL-C8 zellfrei hergestellten Proteine. Zunächst wurde das Protein in einem größeren Maßstab hergestellt, der präparativen zellfreien Synthese, dann gereinigt und konzentriert, in Liposomen rekonstituiert und anschließend mit einer geeigneten Messmethode funktionell getestet. Im Arbeitskreis konnte bereits durch S. Bock in Brij78 zellfrei hergestelltes M2-Kanal in Liposomen eingebaut werden und mit dem SURFE²R auf ihre Funktionalität hin getestet werden. Der Vorteil bei der Testung des M2-Kanals ist, dass durch Amantadin der Kanal blockiert werden kann und dieses auch im Arbeitskreis bereits durchgeführt und am SURFE²R auch beobachtet wurde [95]. Voraussetzung für eine Funktionstestung des M2-Kanals am SURFE²R ist, dass das Protein auch in den Liposomen eingebaut wird. Daher wurde nach der Rekonstitution eine Saccharose-Gradienten-Zentrifugation durchgeführt, um die Effizienz des Einbaus zu überprüfen.

Die Vorgehensweise vom präparativen Ansatz bis hin zur Saccharose Gradienten-Zentrifugation ist schematisch in Abbildung 3.13 dargestellt.

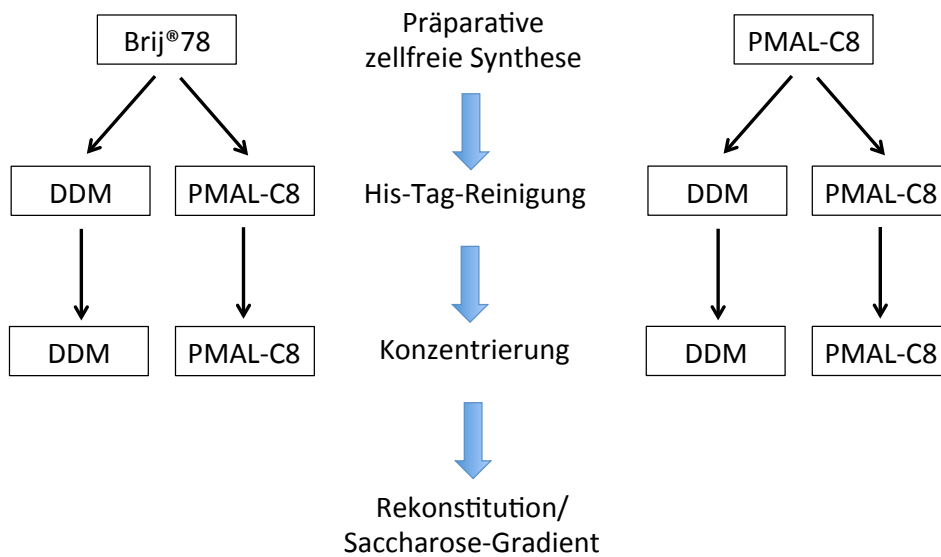


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Reinigung und Rekonstitution eines zellfrei hergestellten Proteins.

Es wurden zwei präparative Ansätze angefertigt, einmal ein Ansatz mit dem Detergenz Brij78 und einmal ein Ansatz mit 1 mg/mL PMAL-C8. Für die His-tag Reinigung, die Konzentrierung sowie für die Rekonstitution und den Saccharose-Gradienten wurde dasselbe Protokoll verwendet. Damit eine Aussage getroffen werden kann, ob oder inwiefern PMAL-C8 den Einbau in Liposomen stören könnten wurden die Ansätze geteilt und einmal mit DDM und einmal mit PMAL-C8 gereinigt (Kapitel 7.1.12). Im nächsten Abschnitt werden die Proben auf folgende Weise abgekürzt: Das Detergenz in dem die präparative zellfreie Synthese (PCF) stattfand, wird zuerst benannt, danach kommt das Detergenz in dem die His-tag Reinigung stattfand (PCF/His-tag Reinigung). Das SDS-Gel (Abbildung 3.14, His-tag Reinigung) zeigte, dass erst ab einer Imidazolkonzentration von 200 mM die Proteinfraktion relativ rein ist. Bei genauerer Betrachtung fällt zudem auf, dass die Proben, die mit PMAL-C8 in Berührung kamen (B78/PMAL-C8; PMAL-C8/DDM und PMAL-C8/PMAL-C8), mehr Banden zeigten, die nicht der Größe des M2-GFP entsprachen. Vermutlich stört das Amphipol die His-tag Reinigung doch in gewisser Weise oder das Amphipol wird ebenfalls vom Coomassie gefärbt.

Nach der Reinigung wurde der Proteingehalt mit dem Bradford-Test bestimmt. Allerdings zeigte PMAL-C8 selbst eine Reaktion mit dem Reagenz. Um die Proteinkonzentration bestimmen zu können, wurden für die Proben, die PMAL-C8 enthiel-

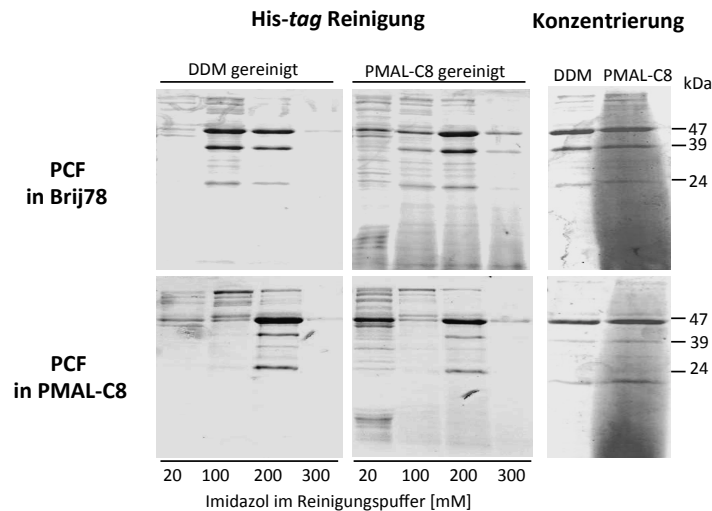


Abbildung 3.14: Coomassie gefärbte SDS-Gele nach der His-tag Reinigung von M2-GFP.

ten, als *Blank* der Reinigungspuffer mit PMAL-C8 verwendet. Für die anschließende Konzentrierung wurden aus den reinsten Fraktionen (ab einer Imidazolkonzentration von 200 mM) das Imidazol entfernt. Der Proteingehalt sollte nach der Konzentrierung ebenfalls mittels Bradford Test bestimmt werden, allerdings konnte der Gehalt für die Fraktion, in dem PMAL-C8 enthalten war nicht bestimmt werden. Daher wurde die Konzentration mit Hilfe der Coomassie gefärbten SDS-Gele geschätzt. Auffällig ist die intensiv gefärbte Spur bei den PMAL-C8 konzentrierten Proben im SDS-Gel.

Die Rekonstitution ist wie in Kapitel 7.1.14 beschrieben durchgeführt worden. Die Liposomen wurden mit Triton X destabilisiert. Danach wurde das solubilisierete Membranprotein dazugegeben und die Detergenzien mittels Biobeads entfernt. Dabei verlieren die Membranproteine ihre lipophile Umgebung und werden gezwungen sich in die Liposomen zu integrieren. Anschließend wurde zur Kontrolle des Proteineinbaus in Liposomen eine Saccharose-Gradienten Zentrifugation durchgeführt (Abbildung 3.15). Hierfür wurden die Proteoliposomen in 30 % Saccharosepuffer suspendiert, in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben und mit abnehmender Saccharosekonzentration überschichtet. Während der Zentrifugation wandern die Proteoliposomen soweit, bis sie die Saccharosekonzentration mit derselben Dichte erreicht haben. Proteoliposomen befanden sich in den Saccharosefraktionen zwischen 15 - 20 %. Leere Liposomen haben eine geringere Dichte und sollten höher wandern (10 - 15 %). Nicht rekonstituiertes Protein verblieb in der untersten 30 %

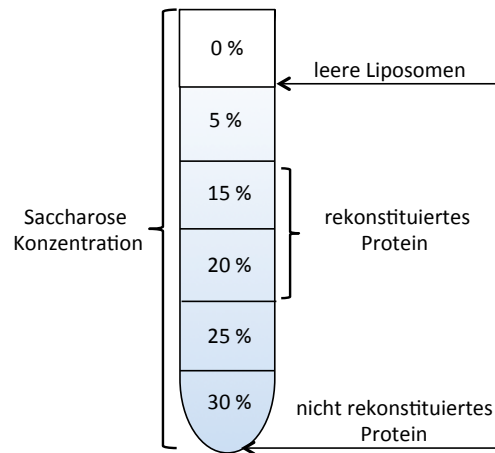


Abbildung 3.15: Saccharose-Gradienten Zentrifugation.

Fraktion. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot Analyse. In Abbildung 3.16

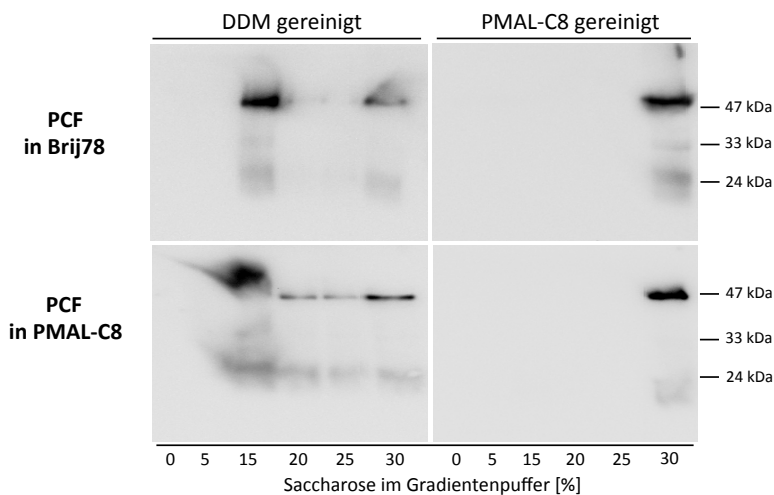


Abbildung 3.16: Saccharose-Gradienten Zentrifugation zum Nachweis der Bildung von Proteoliposomen. Der Antikörper ist gegen GFP gerichtet (anti-GFP (FL)).

sind die Western Blots nach der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation zu sehen. Ein Einbau des Proteins konnte demnach in B78/DDM und PMAL-C8/DDM nachgewiesen werden. Nur ein geringer Anteil an freiem, nicht rekonstituiertem Protein ist in der 30 % Saccharoseschicht zu beobachten. Es befand sich hauptsächlich rekonstituiertes Protein in der 15 % Fraktion. Während bei B78/DDM zwischen den Saccharoseschichten 15 - 30 % eher weniger Protein vorzufinden war, wurde bei PMAL-

C8/DDM eine Verschleppung des Proteins über die Zwischenschichten 20 und 25 % beobachtet. Dieses Phänomen könnte an einer nicht ausreichenden Zentrifugationsdauer liegen, oder aber PMAL-C8 hat diese Verschleppung verursacht. Am auffälligsten ist die Tatsache, dass die in PMAL-C8 gereinigten und konzentrierten Proben B78/PMAL-C8 und PMAL-C8/PMAL-C8 keinerlei rekonstituiertes Protein beinhalten. Eine mögliche Erklärung ist, dass während der Konzentrierung neben dem Protein auch PMAL-C8 aufkonzentriert wurde. Für diesen Schritt werden spezielle AMICON[®] ULTRA-4 Zentrifugationsfilter mit einem *cut off* von 10 kDa verwendet. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde mit dem Reinigungspuffer aufgefüllt, der zuvor auch in der His-*tag* Reinigung verwendet wurde. Damit das Protein nicht ausfällt, ist in dem Reinigungspuffer auch das entsprechende Detergenz bzw. PMAL-C8 enthalten. Um diese Frage zu klären, wurde das Protokoll für die Konzentrierung dahingehend verändert, indem PMAL-C8 in dem Reinigungspuffer II weggelassen wurde. Die entsprechenden Western Blots der Saccharose-Gradienten Zentrifugation nach dem veränderten Protokoll sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass nach dem veränderten Protokoll auch Proteineinbau in den Proben B78/PMAL-C8 und PMAL-C8/PMAL-C8 erfolgte. Demnach stört eine erhöhte Konzentration an PMAL-C8 die Integration von M2-Kanal in die Liposomen. Die intensive Spurverfärbung, die zuvor im SDS-Gel (Abbildung 3.14) beobachtet wurde, ist nach dem neuen Protokoll verschwunden (SDS-Gele nach dem veränderten Konzentrierungsschritt sind nicht dargestellt).

3.2.4 Funktionstestung des in PMAL-C8 hergestellten M2-Kanals am SURFE²R

Die genaue Durchführung und Auswertung erfolgte durch S. Bock [95]. Es zeigte sich in den Messungen, dass der M2-Kanal in B78/DDM Protonenleitfähigkeit zeigte und auch durch Amantadin bis zu 50 % inhibiert werden konnte. Die anderen Proben B78/PMAL-C8, PMAL-C8/DDM und PMAL-C8/PMAL-C8 zeigten zwar Protonenleitfähigkeit, aber wurden nicht signifikant durch Amantadin inhibiert. Die Konzentration des eingesetzten Amantadins betrug 100 μ M.

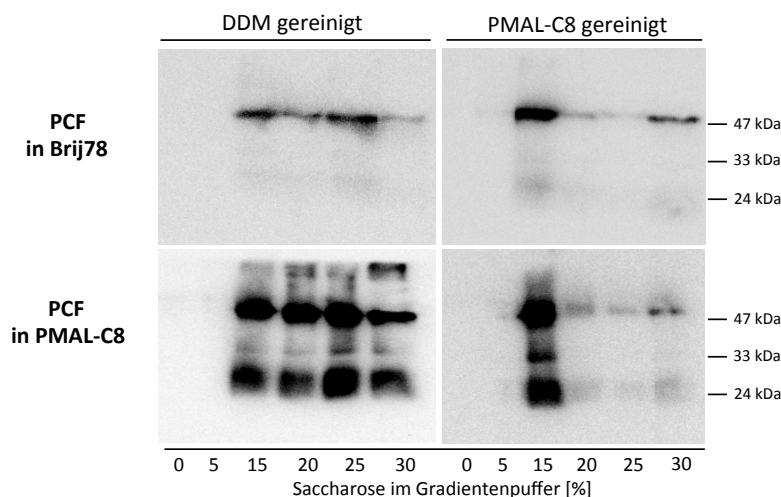


Abbildung 3.17: Saccharose-Gradienten Zentrifugation nach dem veränderten Protokoll für die Konzentrierung. Der Antikörper ist gegen GFP gerichtet (anti-GFP (FL)). Die Durchführung der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, sowie die anschließende Western Blot Analyse für die Proben PMAL-C8/DDM und PMAL-C8/PMAL-C8 wurden von S. Bock ausgeführt.

3.3 Untersuchungen zur Pentamidinaufnahme in *Trypanosoma brucei*

Die Pentamidinaufnahme in *Trypanosoma brucei* konnte mit einem Aquaglyceroporin (*TbAQP2*) in Verbindung gebracht werden [71, 84]. Aquaglyceroporine besitzen eine aromatischen/Arginin-Region (ar/R-Region). Sie ist mit $3,4 \text{ \AA}$ die engste Stelle des Kanals und hat neben dem Größenausschluß noch die Funktion eines Protonenfilters. Aufgrund der positiven Seitenkette des Arginins werden Protonen in diesen Bereich ausgeschlossen [76, 77]. In *TbAQP2* befindet sich anstelle eines Arginins ein Leucin. Demnach wurde vermutet, dass die Pentamidinaufnahme durch die direkte Passage von *TbAQP2* aufgrund seines ungewöhnlichen Selektivitätsfilters erfolgt [84]. Allerdings ist das Pentamidin, zusätzlich zur positiven Ladung, fast viermal größer als Glycerol (Abbildung 3.18). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Pentamidinaufnahme nicht durch eine direkte Passage von *TbAQP2* erfolgen kann. Um eine Aussage über den Mechanismus der Pentamidinaufnahme treffen zu können, wurden verschiedene Messungen durchgeführt und eigens für die Messungen Moleküle entworfen und synthetisiert.

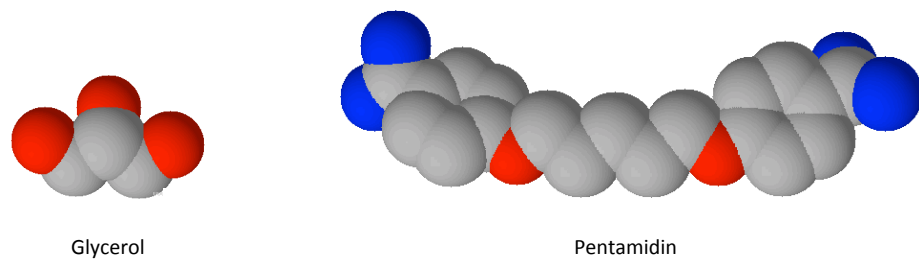


Abbildung 3.18: Größenvergleich eines Glycerols mit einem Pentamidin.

3.3.1 Voruntersuchungen zur *TbAQP2*

Die folgenden Durchführungen und Messungen wurden im Arbeitskreis durch J. Song durchgeführt und ausgewertet. Um nachzuweisen inwiefern Pentamidin mit *TbAQP* interagiert, wurde *TbAQP2* in Hefen rekombinant hergestellt und die Protoplasten daraus isoliert. Anschließend wurde die Glycerolleitfähigkeit in einer dynamischen Lichtstreuungsmessung an einer *Stopped-flow* Apparatur gemessen. In dem Protoplastenschwelltest konnte eine Glycerolleitfähigkeit nachgewiesen werden. Die schwarze Kurve in Abbildung 3.19 (A) zeigt deutlich, dass bei Abwesenheit von Pentamidin, Glycerol in die Protoplasten gelangt und diese anfangen zu schwellen.

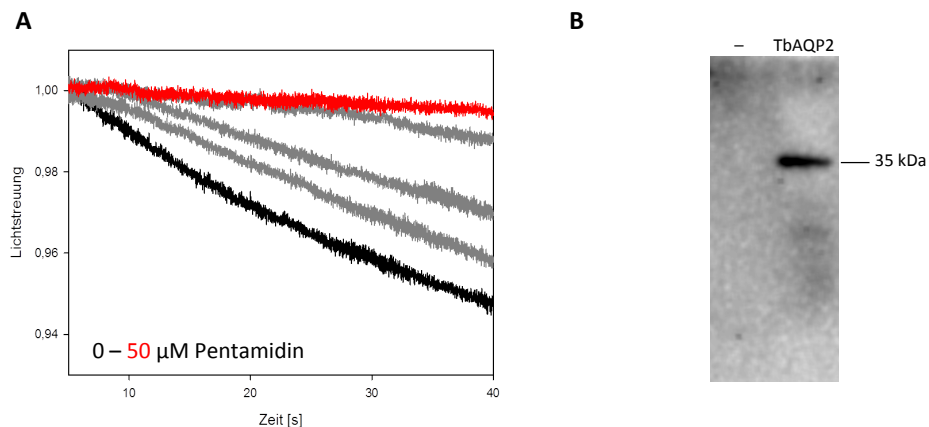


Abbildung 3.19: **A:** Hemmung der Glycerolleitfähigkeit von *TbAQP2* durch Pentamidin. **B:** Nachweis von *TbAQP2* in Hefeprotoplasten mittels Western Blot Analyse. Das *TbAQP2* besitzt am C-terminalen Ende einen HA-Tag und die Größe beträgt 35 kDa. Der eingesetzte Primärantikörper ist gegen den HA-Tag gerichtet. In der linken Spur (-) wurden leere Protoplasten, als Negativkontrolle, aufgetragen.

Die Glycerolleitfähigkeit konnte durch den Zusatz von Pentamidin gehemmt werden. Nach Zugabe von Pentamidin (graue Kurven) flacht die Kurve ab, bis eine Pentamidinkonzentration von $50 \mu\text{M}$ eingesetzt wurde (rote Kurve), wo *TbAQP2* vollständig inhibiert wurde. In einem Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass die eingesetzten Protoplasten auch das Protein *TbAQP2* enthielten (Abbildung 3.19 B). Der Hemmeffekt von Pentamidin auf die Glycerolleitfähigkeit wurde bei pH 7,2 bestimmt. Es hat sich herausgestellt, dass das Pentamidin *TbAQP2* recht gut hemmen kann ($\text{IC}_{50} = 130 \text{ nM}$, Abbildung 3.20 grüne Kurve). Die Messung wurde zusätzlich bei zwei anderen pH-Werten 3,5 und 2,5 durchgeführt. Es ist eine pH-Abhängigkeit zu sehen, wobei sich die Bindung von Pentamidin achtmal verschlechtert (pH 2,5, $\text{IC}_{50} = 1,1 \mu\text{M}$).

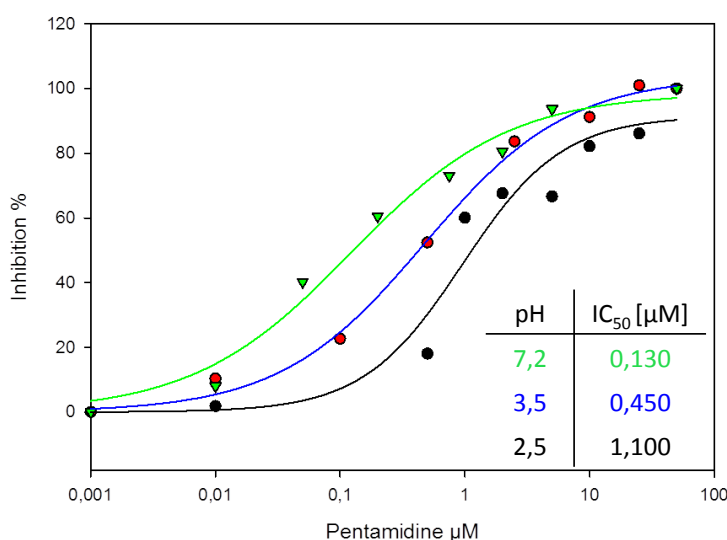
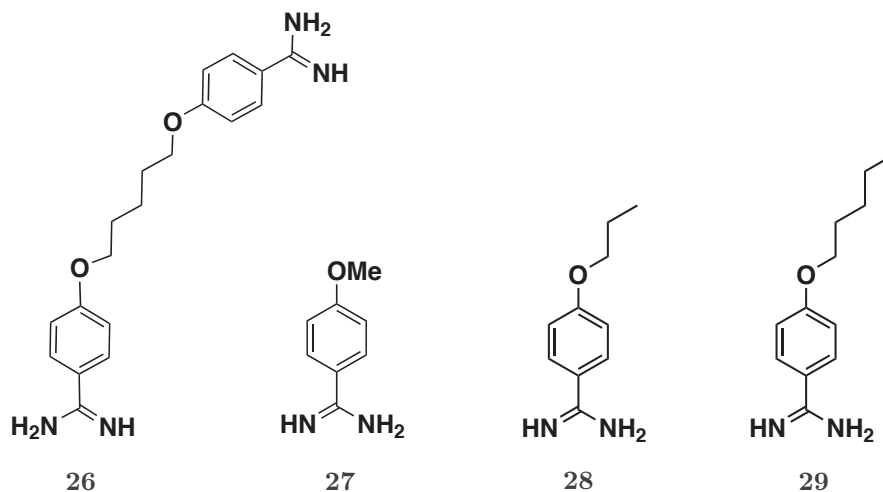


Abbildung 3.20: Konzentrations- und pH-abhängige Hemmung von *TbAQP2* via Pentamidin.

3.3.2 Synthese von Pentamidin-Analoga

In den Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass Pentamidin *TbAQP2* nicht direkt passieren kann, sondern das Protein hemmt. Hier stellt sich die Frage, welche Strukturmerkmale eine Substanz besitzen muss, um die Glycerolleitfähigkeit von *TbAQP2* zu hemmen. Reicht eine Benzamidin-Gruppe aus oder spielt die Länge der Seitenket-

te ebenfalls eine Rolle? Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, sollten Pentamidin-Analoga synthetisiert und getestet werden. Die Pentamidin-Analoga sind in Schema 3.9 dargestellt. 4-Methoxybenzamidin (**27**) wurde käuflich erworben. Die beiden anderen Verbindungen 4-Propoxybenzamidin (**28**) und 4-Pentoxybenzamidin (**29**) sollten synthetisiert werden. Für die Synthese von Amidinen sind mehrere Wege

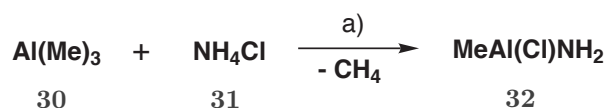


Schema 3.9: Struktur der Pentamidin-Analoga.

in der Literatur beschrieben. Viele gehen von einem Nitril aus, aus dem dann das Amidin generiert wird. Es gibt die Möglichkeit aus dem Nitril ein Amidoxim [96, 97] zu generieren und dieses anschließend zu reduzieren. Eine weitere Möglichkeit das Amidin herzustellen bietet die sogenannte Pinner Reaktion. Hierbei werden gasförmiges HCl und Ammoniak eingesetzt. Nach HCl-Behandlung entsteht zunächst ein Pinner Salz. Das Pinner Salz kann mit unterschiedlichen Nucleophilen reagieren und in dem Fall von Ammoniak entsteht dann ein Amidin. Allerdings erfordern diese Reaktionen immer mehrere Schritte. Ein weiterer möglicher Syntheseweg wurde 1990 durch Garigipati [98] beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Einstufenreaktion und bei der die Amidinfunktion über ein Aluminiumreagenz vermittelt wurde. Analog zu der Vorschrift von Garigipati wurden die beiden Verbindungen 4-Propoxybenzamidin (**28**) und 4-Pentoxybenzamidin (**29**) hergestellt. Ausgehend von 4-Hydroxybenzonnitril (**33**) wurden zunächst die Seitenketten über eine Williamson Ethersynthese angebracht. Anschließend wurde aus der Nitrilgruppe ein Amidin generiert. Die Williamson Ethersynthese erfolgte in Aceton und als Base wurde Kaliumcarbonat verwendet. Nach säulenchromatografischer Reinigung konnte die Nitrilverbindung mit der Propoxykette **36** mit 55 % und die Verbindung mit

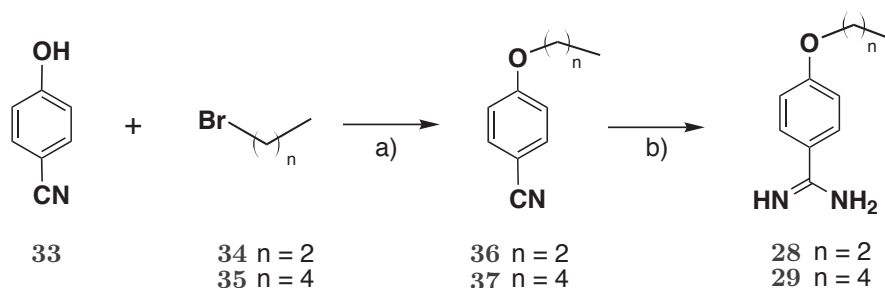
der Pentoxykette **37** mit 60 % Ausbeute erhalten werden. Für den nächsten Schritt musste zunächst das Aluminiumreagenz **32** hergestellt werden (Schema 3.10).

Dazu wurde Trimethylaluminium (**30**) unter Eiskühlung zu einer Suspension aus Ammoniumchlorid **31** und trockenem Toluol gegeben. Zwei Methylgruppen werden durch ein Chlorid und einem Amid substituiert und die beiden Methylgruppen werden in Form von Methangas freigesetzt. Diese Lösung wurde entweder am selben Tag mit einem Nitril umgesetzt oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und erst am nächsten Tag verwendet.



Schema 3.10: Synthese von Aluminiumreagenz **32** a) trockenes Toluol, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann 1 h Raumtemp.

Die Umsetzung der Nitrile **36** und **37** mit dem Aluminiumreagenz **32** erfolgte in trockenem Toluol und wurde über Nacht bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt (Schema 3.11). Anschließende chromatografische Reinigung führte zu den reinen Amidinen **28** und **29** mit einer Ausbeute von 13 - 30 %.



Schema 3.11: Synthese der Pentamidin-Analoga 4-*n*-Propoxybenzamidin (**28**) und 4-*n*-Pentoxybenzamidinen (**29**). a) Kaliumcarbonat, trockenes Aceton, 16 h Rückfluss, b) MeAl(Cl)NH_2 (**32**), trockenes Toluol, 16 h, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3 Hemmung der Glycerolleitfähigkeit von *TbAQP2* durch die Pentamidin-Analoga

Die synthetisierten Pentamidin-Analoga 4-*n*-Propoxybenzamidin (**28**) und 4-*n*-Pentoxybenzamidin (**29**) wurden, wie im Kapitel 3.3.1 beschrieben, an Hefeprotoplasten, die *TbAQP2* enthielten, getestet. Die Messungen erfolgten an einer *Stopped flow* Apparatur und wurden durch J. Song durchgeführt und ausgewertet. Alle Messungen erfolgten bei pH 7,2. In Abbildung 3.21 kann man gut erkennen, wie sich die Kurven zu höheren Konzentrationen verschieben. Pentamidin hemmt *TbAQP2* am besten mit einem $IC_{50} = 0,130 \mu M$, gefolgt von 4-Pentoxybenzamidin ($IC_{50} = 87 \mu M$). Am schlechtesten inhibiert 4-Propoxybenzamidin, dessen IC_{50} -Wert sich im millimolaren Bereich befindet (Tabelle 3.2).

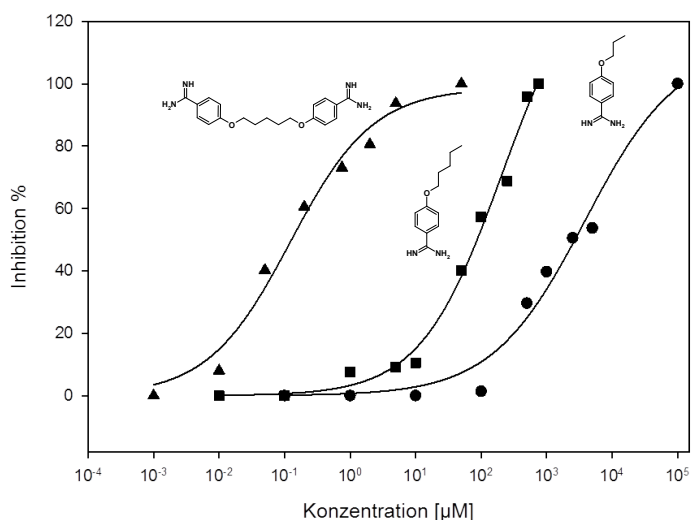


Abbildung 3.21: Konzentrationsabhängige Hemmung von *TbAQP2* durch die Pentamidin-Analoga 4-Propoxybenzamidin (**28**) und 4-Pentoxybenzamidin (**29**).

Tabelle 3.2: IC_{50} -Werte der Pentamidin-Analoga **28** und **29**.

Substanz	IC_{50} [μM]
Pentamidin (26)	0,130
4-Pentoxybenzamidin (28)	87
4-Propoxybenzamidin (29)	2839

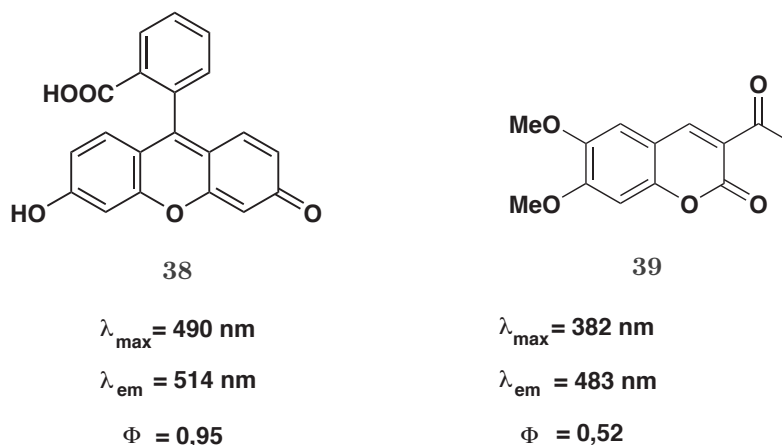
4-Methoxybenzamidin wurde bis in den millimolaren Bereich eingesetzt und zeigte keinerlei Inhibition der Glycerolleitfähigkeit. Durch den Verlust der zweiten Benzamidinfunktion in 4-*n*-Pentoxybenzamidin **29** wird die Bindung des Moleküls an *Tb*AQP2 etwa 700× geschwächt. Wurde die Seitenkette zusätzlich verkürzt von Pentoxy zu Propoxy, so ist die Bindung im Vergleich zu Pentamidin 2000× schwächer. Aus den Messungen geht hervor, dass die zweite Benzamidinfunktion wichtig ist für eine Inhibition von *Tb*AQP2 im nanomolaren Bereich, aber Benzamidin alleine reicht nicht aus um einen Effekt zu erzielen. Die Länge der Seitenkette spielt für die Inhibition ebenfalls eine Rolle.

3.3.4 Synthese von fluoreszierenden Pentamidin-Analoga

Wenn Pentamidin (**26**) nicht direkt *Tb*AQP2 passiert, wie wird es dann vom Trypanosomen aufgenommen? *Tb*AQP2 ist lokalisiert in der Flagellumtasche des Trypanosoms [84]. In der Flagellumtasche erfolgt die Nährstoffaufnahme aus dem Blut, dort finden Prozesse wie Exo- und Endocytose statt. Unsere Hypothese für den Mechanismus der Pentamidinaufnahme ist, dass Pentamidin (**26**) an *Tb*AQP2 bindet und das gebundene Pentamidin über den Prozess der Endocytose aufgenommen wird. Um diesen Aufnahmeweg unter dem Mikroskop zu verfolgen, sollten fluoreszierende Pentamidin-Analoga entworfen und synthetisiert werden.

Vorüberlegungen zur Struktur des fluoreszierenden Pentamidin-Analogen

Die Untersuchungen in Kapitel 3.3.3 zeigten, dass durch den Verlust der zweiten Benzamidin-Gruppe immer noch eine Bindung an das *Tb*AQP2 erfolgen kann. Daher sollte das fluoreszierende Pentamidin-Analogon an einem Ende anstatt einer Benzamidin-Gruppe, einen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Der Fluoreszenzfarbstoff sollte zunächst einmal eine hohe Quantenausbeute besitzen und vorallem in dem Bereich zwischen 350 - 500 nm anregbar sein, da herkömmliche Mikroskope und UV-Lampen Licht dieser Wellenlängen produzieren können und somit der Nachweis vereinfacht wird. Der Farbstoff sollte chemisch stabil und in wenigen Syntheseschritten herstellbar sein. Fluoreszenzfarbstoffe, die geeignet wären, sind zum Beispiel Fluorescein (**38**) und Cumarin (**39**) (Schema 3.12). Fluorescein (**38**) besitzt eine besonders hohe Quantenausbeute ($\Psi = 0,95$, [99]), allerdings ist das Molekül recht voluminös. Da es keine Kristallstruktur von *Tb*AQP2 gibt, kann nicht vorhergesagt



Schema 3.12: Struktur der Fluoreszenzfarbstoffe, die für das fluoreszierende Pentamidin-Analogon eingesetzt werden.

werden, ob Fluorescein nicht zu groß für den Kanal wäre. Daher wurde zusätzlich das kleinere Cumarin (**39**) für die Synthese ausgewählt. Cumarin (**39**) selbst zeigt keine Fluoreszenz, aber durch entsprechende Substitutionen wird ein fluoreszierendes Molekül erzeugt. Ein Beispiel für ein fluoreszierendes Cumarin-Derivat ist das 6,7-Dimethoxy-3-acetylcumarin mit einer Quantenausbeute von $\Psi = 0,52$ [100]. Beide Fluoreszenzfarbstoffe sollten über eine Etherbindung mit dem Rest des Pentamidins (**26**) verknüpft werden. Die Alkoxykette zwischen dem Benzamidin und dem Fluoreszenzfarbstoff sollte mindestens aus fünf Kohlenstoffatomen bestehen. Die Zielstruktur des fluoreszierenden Pentamidin-Analogon ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

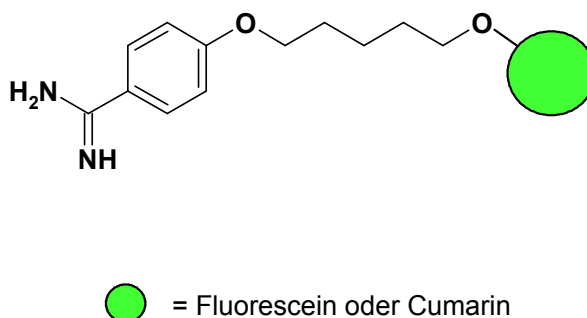
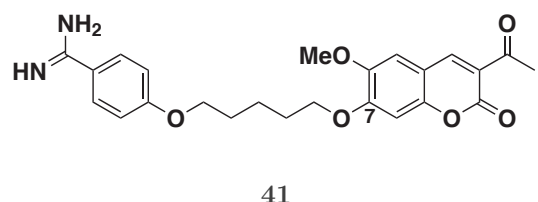
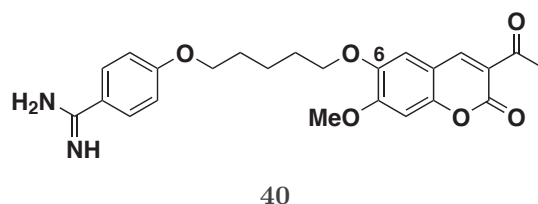


Abbildung 3.22: Zielstruktur des fluoreszierenden Pentamidin-Analogon.

3.3.5 Synthese von Cumarin-Pentamidin-Analoga

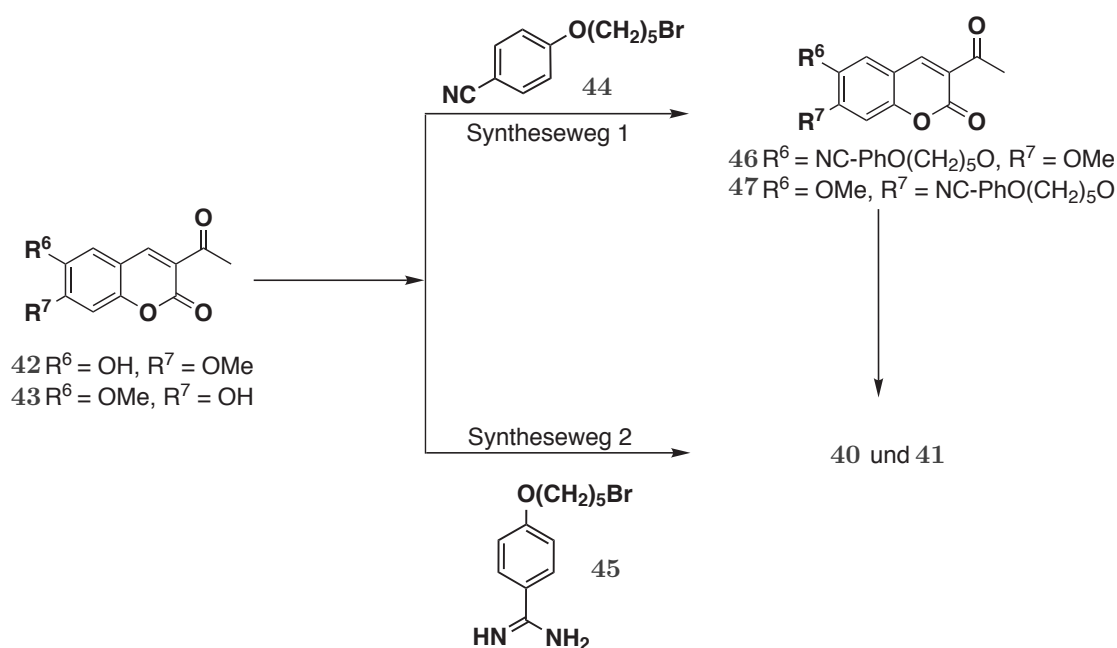
Die Verknüpfung mit der Amidinfunktion sollte über eine Etherbindung erfolgen. Diese Verknüpfung kann anstelle der Methoxygruppe entweder an der 6. oder 7. Position erfolgen (Schema 3.13). Je nach Art und Position der Substituenten können Emissionswellenlänge und Quantenausbeute stark variieren. Takadate *et al.* [100] berichtete, dass durch Ersetzen der Methoxygruppe an der 6. Position, die Fluoreszenz stärker herabgesetzt wurde, als wenn die Methoxygruppe an der 7. Position substituiert wurde. Allerdings wurde als Substituent eine Acetylgruppe eingesetzt, also ein elektronenziehender Substituent. Im jetzigen Fall ist eine Alkylkette zwischen der Amidinfunktion und dem Fluoreszenzfarbstoff. Daher sollte sich dieser Substituent nicht so stark auf die Fluoreszenz auswirken, unabhängig von der Position, an der er sich befindet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten beide Formen der Cumarin-Pentamidin-Analoga synthetisiert werden.



Schema 3.13: Struktur der Cumarin-Pentamidin-Analoga **40** und **41**.

In vielen Publikationen wird die Synthese von unsymmetrisch substituierten Cumarine an der 6. und 7. Position beschrieben, unter anderem ein Derivat mit einer Methoxygruppe und einer Hydroxygruppe [100, 101, 102]. Die Synthese der Cumarin-Pentamidin Analoga sollte von dem 3-Acetyl-6-hydroxy-7-methoxycoumarin (**42**) und 3-Acetyl-6-methoxy-7-hydroxycoumarin (**43**) ausgehen. Über eine Williamson Ethersynthese können unterschiedliche Substituenten mit der Hydroxygruppe

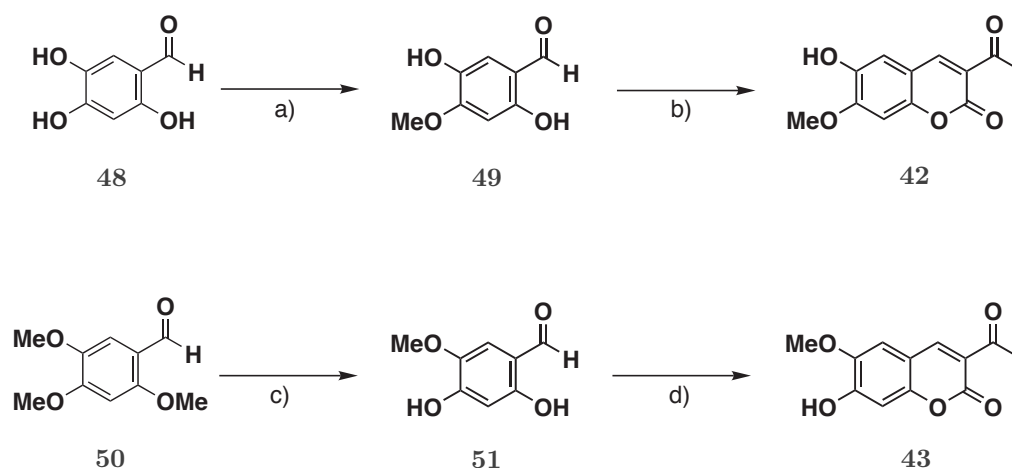
reagieren. Es gibt zwei Wege, um die beiden Zielmoleküle mit der Amidinfunktion zu synthetisieren. Der erste Weg ist zuerst die Vorstufe des Amidins, das Nitril, mit dem Cumarin-Derivat zu verknüpfen und danach erst aus dem Nitril das Amidin herzustellen (Schema 3.14, Syntheseweg 1). Beim zweiten Weg wird die Amidinfunktion zuerst aus einer Nitrilfunktion generiert und anschließend in einer Williamson-Ethersynthese mit dem Cumarin-Derivat verknüpft (Schema 3.14, Syntheseweg 2).



Schema 3.14: Syntheseübersicht der Cumarin-Pentamidin-Analoga **40** und **41**.

Für beide Wege mussten zunächst die asymmetrisch substituierten Cumarin-Derivate **42** und **43** hergestellt werden. Die Synthesen sind in Schema 3.15 dargestellt und verliefen jeweils über drei Stufen. Für die Synthese von 3-Acetyl-6-hydroxy-7-methoxycumarin (**42**) wurde von 2,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (**48**) ausgegangen. Nach einer Vorschrift von Hadari *et al.* [103] wurde die 4-Hydroxygruppe des Aldehyds **48** in trockenem *N,N*-Dimethylformamid mit Methyljodid methyliert. Als Base wurde Cäsiumcarbonat verwendet. Das Produkt **49** konnte nach Waschen mit Wasser und Methanol mit einer Ausbeute von 33 % erhalten werden. Allerdings konnte im Massenspektrum nachgewiesen werden, dass teilweise auch doppelt und dreifach methylierte Nebenprodukte entstanden waren. Das Gemisch wurde trotzdem für die nächste Stufe verwendet, da die unerwünschten Nebenprodukte im nächsten Schritt durch Säulenchromatografie entfernt werden konnten. Anschließend wurde analog

der Vorschrift von Murata *et al.* der Aldehyd **49** in abs. Ethanol mit Ethylacetoacetat und Piperidin versetzt und unter Rückfluss 2 h erhitzt. Nach säulenchromatografischer Reinigung wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 65 % erhalten. Das Piperidin dient zur Deprotonierung des Ethylacetoacetats, damit diese die Aldehydgruppe angreifen kann. Unter Abspaltung von Wasser und Ethanol wird in einer Cyclisierungsreaktion der Heterocyclus generiert.

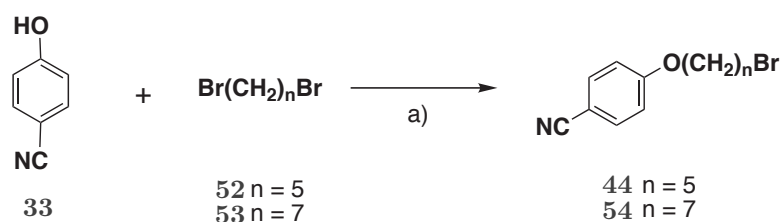


Schema 3.15: Synthese der asymmetrisch substituierten Coumarin-Derivate 3-Acetyl-6-hydroxy-7-methoxycoumarin (**42**) und 3-Acetyl-6-methoxy-7-hydroxycoumarin (**43**). a) Methyljodid, Cs_2CO_3 , DMF, erst 30 min 0°C , dann 16 h Raumtemp. b) Ethylacetoacetat, Piperidin, abs. Ethanol, 2 h Rückfl. c) AlCl_3 , DCM, erst 2 h Rückfl., dann 16 h Raumtemp. d) Ethylacetoacetat, Piperidin, abs. Ethanol, 2 h Rückfl.

Für die Synthese von 3-Acetyl-6-methoxy-7-hydroxycoumarin (**43**) wurde von 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (**50**) ausgegangen. Zunächst wurde nach einer Vorschrift von Cai *et al.* der Aldehyd **50** in Dichlormethan mit Aluminiumchlorid versetzt und anschließend sauer hydrolysiert. Der demethylierte Aldehyd **51** konnte nach Umkristallisation aus Toluol mit einer Ausbeute von 74 % erhalten werden. Die Coumarinsynthese wurde ebenfalls mit Ethylacetoacetat und Pyridin in absolutem Ethanol durchgeführt. Nach säulenchromatografischer Reinigung konnte 3-Acetyl-6-methoxy-7-hydroxycoumarin (**43**) mit einer Ausbeute von 19 % erhalten werden.

Synthese der Cumarin-Pentamidin-Analoga über Weg 1

Über den Syntheseweg 1 wurde zunächst das Nitril **44** mit den Cumarinen **42** und **43** in einer Williamson-Ethersynthese verknüpft. Anschließend sollte die Amidin-funktion generiert werden. Das Nitril **44** konnte nicht kommerziell erhalten werden und wurde daher in einer einstufigen Synthese nach einer Vorschrift von Blower *et al.* [104] ausgehend von 4-Hydroxybenzonnitril (**33**) hergestellt (Schema 3.16). In einer

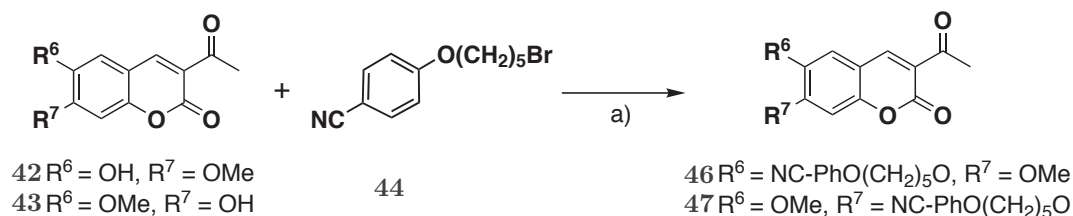


Schema 3.16: Synthese von 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (**44**) und 1-Brom-7-(4-cyanophenoxy)heptan (**54**) in einer Williamson-Ethersynthese. a) Kaliumcarbonat, tr. Aceton, 2,5 h Rückfl., danach 16 h Raumtemp.

Williamson-Ethersynthese konnte die Hydroxyverbindung **33** mit 1,5-Dibrompentan (**52**) und Kaliumcarbonat als Base zu 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (**44**) umgesetzt werden. In der Originalvorschrift sollte das Produkt **44** im Vakuum destilliert und anschließend umkristallisiert werden. Da auf diesem Wege das Produkt **44** nicht erhalten werden konnte, wurde der Reinigungsschritt verändert. Durch Verunreinigungen von nicht umgesetztem 1,5-Dibrompentan (**51**) wurde das Rohprodukt als Öl erhalten. Erst nach einiger Zeit fiel das Produkt als weißer Feststoff aus. Das flüssige 1,5-Dibrompentan (**51**) konnte dann aus dem Gemisch abpipettiert werden und nach säulenchromatografischer Reinigung wurde 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (**44**) mit einer Ausbeute von 21 % erhalten. Eine Nitrilvariante mit einer längeren Bromkette **54** konnte analog zu der beschriebenen Vorschrift hergestellt werden. Für die Synthese wurde anstatt 1,5-Dibrompentan (**51**), 1,7-Dibromheptan (**53**) eingesetzt. Die Ausbeute des 1-Brom-7-(4-cyanophenoxy)heptans (**54**) betrug 22 %. Als Nebenprodukt wurde in beiden Synthesen immer die symmetrischen Verbindungen 1,5-Bis-(4-cyanophenoxy)pentan bzw. 1,7-Bis-(4-cyanophenoxy)heptan erhalten, die säulenchromatografisch abgetrennt werden konnten.

Analog einer Vorschrift von Cai *et al.* [102] sollte im nächsten Schritt die Veretherung durchgeführt werden. Darin wurden erfolgreich und in hohen Ausbeuten verschiedene Alkyl und aromatische Halogenide mit 6-Methoxy-7-hydroxycumarine umgesetzt. Die Reaktion erfolgte in trockenem Aceton und wurde 2 h unter Rückfluss

erhitzt. Als Base wurde Kaliumcarbonat verwendet. Entsprechend dieser Vorschrift wurde die Reaktion zuerst an 3-Acetyl-6-hydroxy-7-methoxycumarin (**42**) durchgeführt, bei dem die Hydroxy- und Methoxysubstituenten an der 6. und 7. Position vertauscht sind (Schema 3.17).



Schema 3.17: Synthese der Nitrilverbindungen **46** und **47**. a) siehe Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Ausbeuten und veränderte Reaktionsbedingungen bei der Synthese der Nitrilverbindungen **46** und **47**.

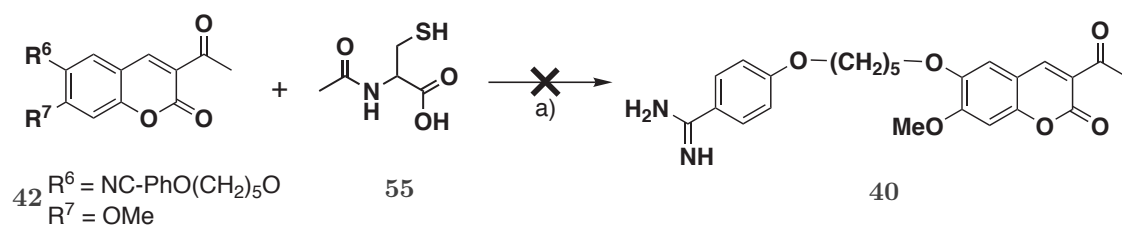
Produkt	Lösungsmittel	Base/Katalysator	Temperatur	Ausbeute
46	Aceton	K ₂ CO ₃	60 °C	2 %
46	Aceton	K ₂ CO ₃ /KI	60 °C	13 %
47	DMF	Cs ₂ CO ₃	80 °C	67 %

Der Fortschritt der Reaktion wurde nach 2 h mittels Dünnschichtchromatografie (DC) kontrolliert. Allerdings konnte nur eine geringe Umsetzung beobachtet werden, daher wurde die Reaktionsdauer auf 5 h erhöht. Nach Aufarbeiten und säulenchromatografischer Reinigung konnte das Produkt **46** mit einer Ausbeute von 2 % erhalten werden. Die geringe Ausbeute an Produkt **46** könnte an der Reaktivität der Edukte oder aber auch an den Reaktionsbedingungen liegen. Daher wurden bei der Synthese der Nitrilverbindung **46** auch die Reaktionsbedingungen variiert, um die Ausbeute zu steigern (Tabelle 3.3). Die Reaktionsdauer wurde auf 16 h erhöht und um die Reaktivität des Halogenids zu erhöhen wurde zum Ansatz eine katalytische Menge an Kaliumiodid hinzugefügt. Durch einen Finkelsteinaustausch wird das Bromid durch ein Iodid ersetzt, welches eine bessere Abgangsgruppe darstellt und somit die Reaktivität des Halogenids verbessert. Dadurch konnte die Ausbeute an Produkt **46** von 2 % auf 13 % erhöht werden. Die Williamson Ethersynthese wurde auch mit 3-Acetyl-6-methoxy-7-hydroxycumarin (**43**) und 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (**44**) durchgeführt. Hier wurde allerdings als Lösungsmittel nicht Aceton, sondern

trockenes DMF verwendet. Als Base wurde Cäsiumcarbonat statt Kaliumcarbonat verwendet. Die Reaktion wurde 16 h bei 80 °C gerührt. Nach säulenchromatografischer Reinigung konnte die Nitrilverbindung **47** mit einer Ausbeute von 63 % erhalten werden.

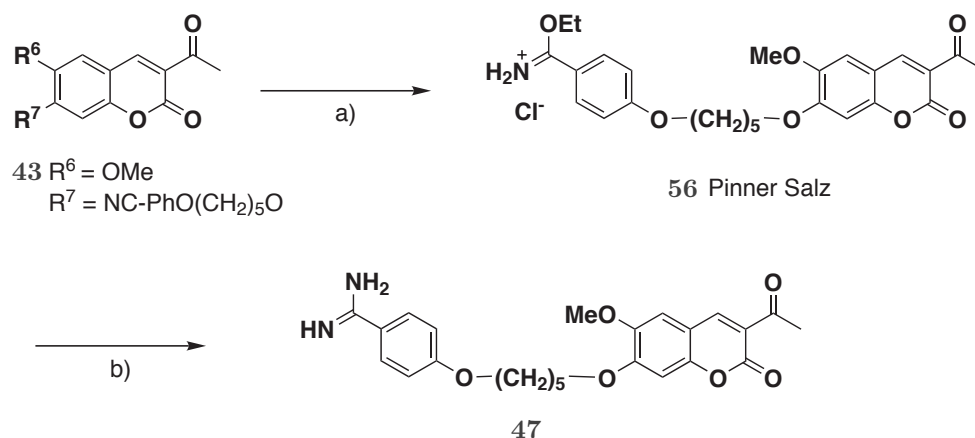
Für die Herstellung der Amidinfunktion aus dem Nitril wurde hier nicht, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, mit dem Aluminiumreagenz **32** gearbeitet.

In der Publikation von Levin *et al.* [105] wurde das Aluminiumreagenz **32** zur Herstellung von Amiden aus Estergruppen beschrieben. Da das Cumarin eine Lactonfunktion, einen cyclisierten Ester, enthält, war zu befürchten, dass neben der Nitrilgruppe auch der Lactonring reagieren könnte. Daher wurden andere Methoden für die Synthese des Amidins andere verwendet. Eine milde Methode wurde in der Publikation von Lange *et al.* [106] beschrieben. Darin wurden selektiv aus dem Nitril einer Verbindung mit vielen unterschiedlichen funktionellen Gruppen, ein Amidin hergestellt. Für die Synthese wurde *N*-Acetylcystein (**55**) als Katalysator verwendet und zur Herstellung des Amidins wurde entweder gasförmiges Ammoniak mehrere Stunden durch die Lösung geleitet oder Ammoniumacetat hinzugegeben.



Schema 3.18: Synthese von Cumarin-Pentamidin-Analogon **40** mit *N*-Acetylcystein (**55**). a) NH₄OAc, Methanol.

Diese Reaktion wurde zunächst an 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (**44**) getestet und anschließend massenspektrometrisch analysiert (Schema 3.18). Die Synthese erfolgte in Methanol und wurde mit *N*-Acetylcystein (**55**) und Ammoniumacetat unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Eine Umsetzung konnte erst nach 24 h beobachtet werden. Diese Reaktion wurde auch mit der Nitrilverbindung **42** durchgeführt. Allerdings konnte das Edukt **42** auch nach Erhitzen nicht vollständig in Methanol gelöst werden. Als Lösungsvermittler wurde Dichlormethan hinzugegeben, aber auch nach 24 h wurde weder mittels DC noch massenspektrometrisch eine Umsetzung beobachtet.

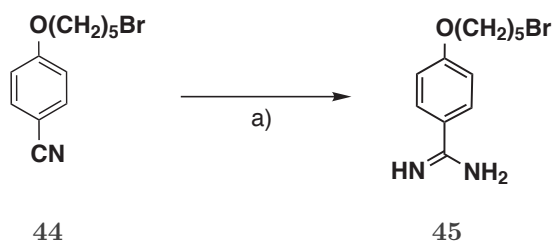


Schema 3.19: Synthese des Cumarin-Pentamidin-Analogen **47** über die Pinner Reaktion. a) trockenes HCl Gas, abs. Ethanol. b) trockenes Ammoniak Gas, abs. Ethanol.

Parallel zu der Reaktion mit *N*-Acetylcystein (**55**) wurde die Pinner Reaktion an der Nitrilverbindung **47** durchgeführt (Schema 3.19). Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Chalifour *et al.* [107] und wurde in abs. Ethanol durchgeführt. Zunächst wurde bei 0 °C trockenes gasförmiges HCl eingeleitet, bis die ethanolische Lösung gesättigt war. Anschließend wurde das Nitril **47** zugegeben, und die Reaktion wurde bei Raumtemperatur mehrere Stunden gerührt bis die Nitrilbande im IR verschwunden war. Auch hier bestand das Löslichkeitsproblem des Nitrils **47** in Ethanol und eine Umsetzung zum Pinner Salz konnte nicht beobachtet werden. Die Reaktion wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol und Chloroform (1:1) wiederholt, damit das Nitril **47** in Lösung ging. Die Reaktionsmischung wurde mittels IR-Spektroskopie kontrolliert und ein Verschwinden der Nitrilbande konnte beobachtet werden. Danach wurde das Pinner Salz **56** bei 0 °C zum abs. Ethanol gegeben, welcher vorher mit Ammoniakgas gesättigt worden war. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionsmischung wurde massenspektrometrisch analysiert. Eine Umsetzung zum Produkt (Masse 439) konnte im Spektrum nicht beobachtet werden. Im Spektrum wurde hauptsächlich die Masse von 469 beobachtet.

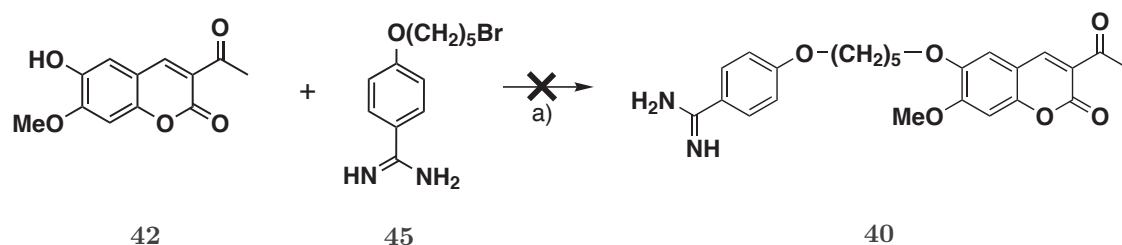
Synthese der Pentamidin-Analoga über Syntheseweg 2

Im zweiten Syntheseweg musste zuerst das Amidin **45** hergestellt werden. Durch die Reaktion von 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (**44**) mit dem Aluminiumreagenz **32** konnte nach säulenchromatografischer Reinigung das Amidin **45** mit einer Ausbeute von 33 % erhalten werden (Schema 3.20).



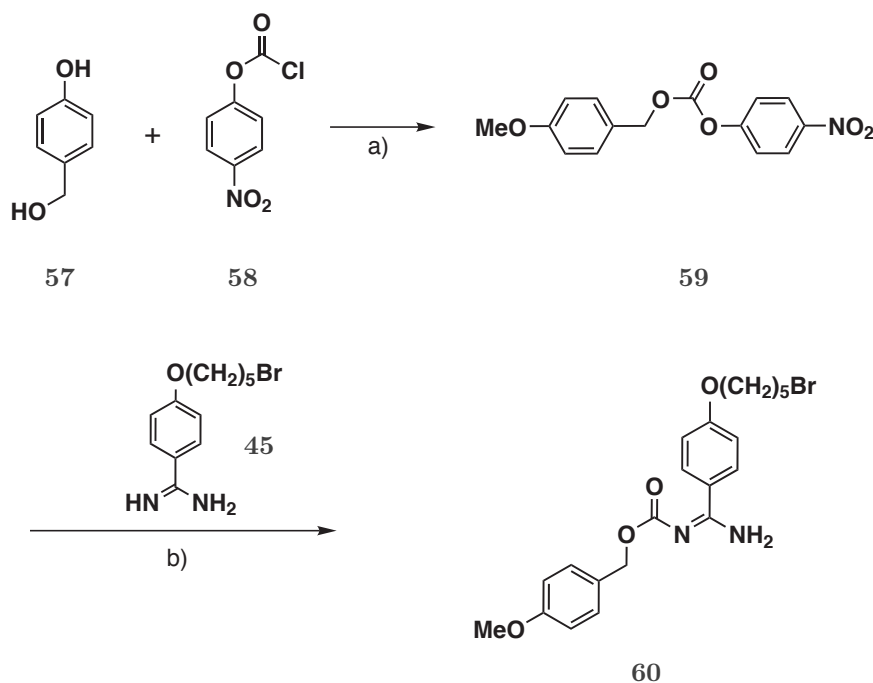
Schema 3.20: Synthese von 4-(1-Brompentoxy)-benzamidin (**45**). a) $\text{MeAl}(\text{Cl})\text{NH}_2$ **32**, trockenes Toluol, 16 h, 80°C .

Das Amidin **45** wurde mit 3-Acetyl-6-hydroxy-7-methoxycumarin (**42**) in einer Williamson Ethersynthese umgesetzt (Schema 3.21). Die Lösung verfärbte sich von tiefrot zu schwarz. Von der Reaktionsmischung wurde ein Massenspektrum angefertigt. Allerdings konnte weder der Massenpeak des Produkts **41**, noch der des Edukts **42** beobachtet werden. Der Cumarinring schien sich zersetzt zu haben. Die Reaktionsbedingungen der Williamson Ethersynthese waren die gleichen, wie im Syntheseweg 1. Nur das Edukt **45** ist ein anderes. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Amidinfunktion hier die Reaktion stört, vielleicht aufgrund ihrer starken Basizität ($\text{p}K_s \sim 12$).



Schema 3.21: Synthese des Cumarin-Pentamidin-Analogen **40**. a) K_2CO_3 , trockenes Aceton, Rückfluss.

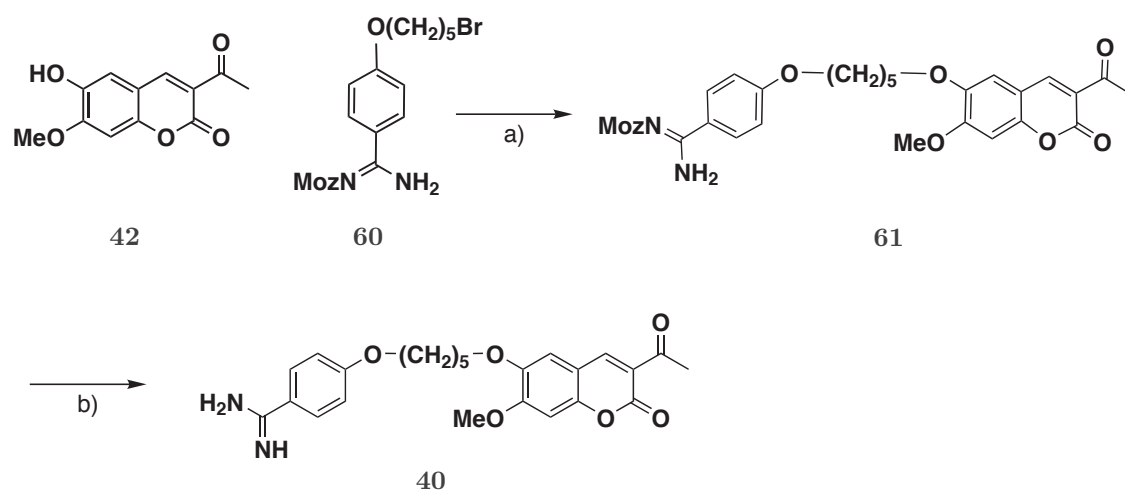
Um den störenden Einfluss der Amidinfunktion zu verhindern, wurde eine Schutzgruppe eingeführt. Nach Jarowicki *et al.* [108] können Amidine mit Hilfe der 4-Methoxybenzylcarbonyl-Gruppe (Moz) geschützt und mit einer 0,5 % Trifluoressigsäure-Lösung wieder entschützt werden.



Schema 3.22: Synthese von 4-Methoxybenzyl-4-nitrophenylcarbonat (**59**) und *N*-(4-Methoxybenzyloxycarbonyl)-4-amidino-1-(5-Brompentoxy)benzol (**60**). a) Pyridin, DCM. b) Triethylamin, DMF.

Zur Übertragung der Schutzgruppe musste zunächst das Reagenz 4-Methoxybenzyl-4-nitrophenylcarbonat **59** hergestellt werden (Schema 3.22). Nach einer Vorschrift von Bailey *et al.* [109] lässt man zur Synthese von **59** *p*-Anisilalkohol (**57**) mit *p*-Nitrophenylchloroformiat (**58**) in Dichlormethan und Pyridin reagieren. Die Reaktion wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und nach säulenchromatografischer Reinigung wurde das Produkt 4-Methoxybenzyl-4-nitrophenylcarbonat (**59**) mit einer Ausbeute von 87 % erhalten. Die Synthese des Amidins **45** wurde in trockenem *N,N*-Dimethylformamid mit Triethylamin durchgeführt. Die Reaktion wurde 3 h bei 50 °C gerührt und nach säulenchromatografischer Reinigung wurde das geschützte Amidin **60** mit einer Ausbeute von 50 % erhalten. Anschließend wurde das geschützte Amidin **60** wiederum in einer Williamson Ethersynthese mit **42** eingesetzt (Schema 3.23). Der Ansatz erfolgte in Aceton und mit Kaliumcarbonat als Base und wurde

mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert. Es konnte eine Umsetzung der Edukte beobachtet werden, allerdings erfolgte die Umsetzung nur sehr langsam. Von dem Reaktionsgemisch wurde ein Massenspektrum aufgenommen, allerdings konnte der Produktpeak nicht nachgewiesen werden. Da aber laut DC eine Umsetzung erfolgte, wurde die Mischung trotzdem für eine Entschützungsreaktion mit Trifluoressigsäure eingesetzt.



Schema 3.23: Synthese von Cumarin-Pentamidin-Analogon (**40**). a) K_2CO_3 , Aceton. b) TFA.

Es wurden zwei Massenproben vorbereitet. In dem einen Gefäß wurde zusätzlich ein Tropfen Trifluoressigsäure zugegeben. Von beiden Proben wurden Spektren aufgenommen und miteinander verglichen (Abbildung 3.23). Mit Trifluoressigsäure werden das Edukt **60** und das Produkt **61** entschützt. Die Masse vom entschützten Edukt **60** konnte nachgewiesen werden. Damit wurde auch gezeigt, dass eine Entschützung der Moz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure mit einfachen Mitteln möglich ist. Die DC-Kontrolle ergab ebenfalls, dass nach der Entschützung das Amidin **45** wieder erhalten wurde. Neben dem Massepeak von **45**, wurde auch die Masse 439 gefunden. Diese Masse entspricht der Masse vom Produkt, dem Cumarin-Pentamidin-Analogon **40**. Das Spektrum gibt einen Hinweis darauf, dass die Reaktion stattfindet.

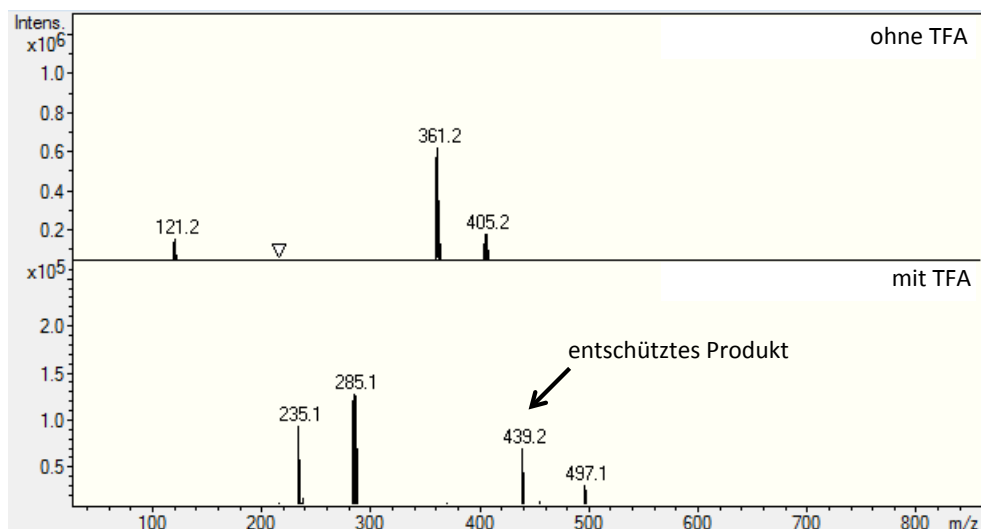
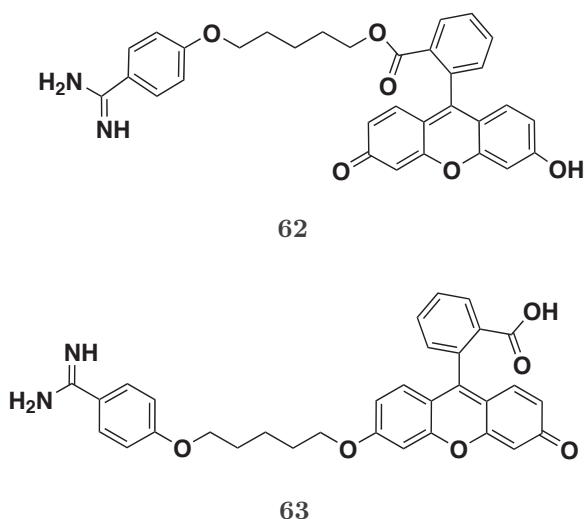


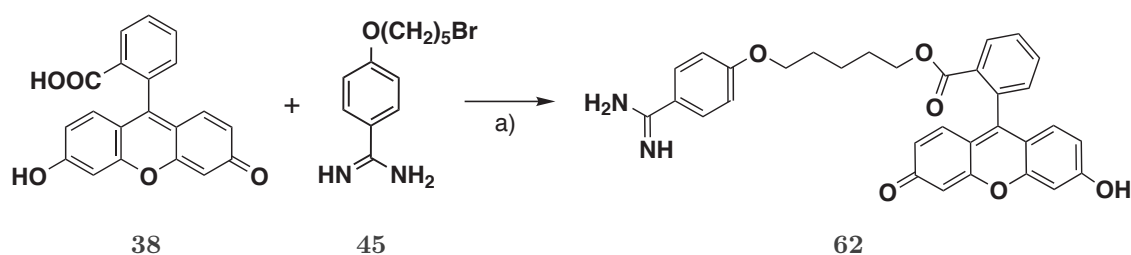
Abbildung 3.23: ESI-Massenspektrum von **40**. Oben ist das Spektrum ohne TFA-Zugabe zu sehen. Unten ist das Spektrum mit TFA-Zugabe zu sehen. Der Pfeil zeigt den Massenpeak vom entschütztes Produkt an.

3.3.6 Synthese von Fluorescein-Pentamidin-Analoga

Fluorescein **38** wurde schon häufig als Fluorophor eingesetzt, um biochemische Prozesse nachzuweisen [99]. Vor allem konnten Modifikationen an der Carboxyl- und an der Hydroxygruppe des Fluoresceins **38** vorgenommen werden, ohne dass die Quantenausbeute zu stark vermindert wurde [110]. Zur Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogen gibt es zwei Möglichkeiten. Die Amidin-Funktion kann entweder mit der Carboxylgruppe verestert oder mit der Hydroxygruppe verethert werden (Schema 3.24). In der Literatur wurde zur Modifikation der Hydroxygruppe unter Anderem auch die Williamson-Ethersynthese angewandt [110, 111]. Für die Williamson-Ethersynthese wurde das Fluorescein nicht als freie Säure eingesetzt, sondern als Methyl- oder Ethylester. Würde man die freie Säure verwenden, könnte unter den gegebenen Reaktionsbedingungen auch eine Veresterung erfolgen [112, 113]. Die beschriebenen Reaktionen sollten verwendet werden, um die beiden Pentamidin-Analoga **62** und **63** herzustellen.

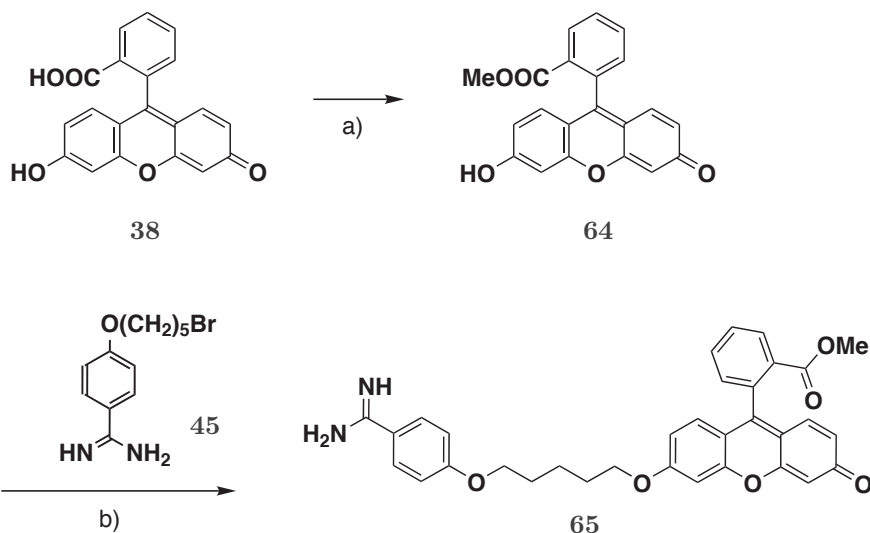
Schema 3.24: Struktur der Fluorescein-Pentamidin-Analoga **62** und **63**.**Synthese der Fluorescein-Pentamidin-Analoga als Ester 62**

Um das Fluorescein-Pentamidin-Analogon als Ester zu erhalten, wurde das Fluorescein als freie Säure und das Amidin **45** eingesetzt (Schema 3.25). In Anlehnung an Li *et al.* [113] erfolgte die Reaktion in trockenem DMF mit Kaliumcarbonat als Base. Der Ansatz wurde mehrere Stunden bei 80 °C erhitzt. Vom Reaktionsgemisch wurde ein Massenspektrum aufgenommen und wie zu erwarten war, wurden zwei unterschiedliche Produkte mit der Masse von 536 beobachtet. Demnach müssten beide Fluorescein-Pentamidin-Analoga **62** und **63** entstanden sein. Nach säulenchromatografischer Reinigung wurde nur ein Produkt mit 20 % Ausbeute isoliert. Die Identifizierung mit Hilfe der NMR-Spektren ergab, dass es sich um den Ester **62** handelte. Die Herstellung und Isolierung des Ethers **63** gelang auf diesem Wege nicht, da als Produkt hauptsächlich der Ester entstand.

Schema 3.25: Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogon **62**. a) K_2CO_3 , tr. DMF, 80 °C, 5 h.

Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogon als Ether

Zur Synthese des Ethers wurde zunächst der Fluorescein-Methylester **64** nach einer Vorschrift von Chen *et al.* [114] hergestellt. Dazu wurde Fluorescein (**38**) in Methanol und konzentrierter Schwefelsäure gelöst und 18 h unter Rückfluss erhitzt. Nach säulenchromatografischer Reinigung wurde der Methylester **64** mit einer Ausbeute von 29 % erhalten. Der Methylester wurde mit dem Amidin **45** in einer Williamson Ethersynthese in Aceton und Kaliumcarbonat als Base umgesetzt (Schema 3.26).



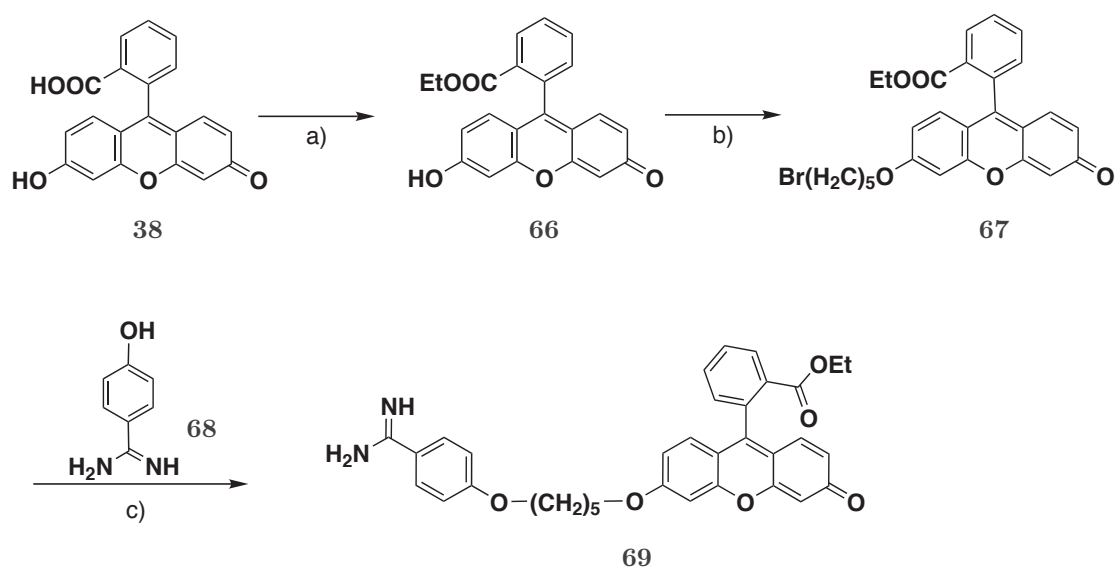
Schema 3.26: Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogon **65**. a) Methanol, H_2SO_4 , 16 h Rückfl. b) siehe Tabelle 3.4.

Tabelle 3.4: Eingesetzte Reaktionsbedingungen zur Synthese von Fluorescein-Pentamidin-Analogon **65**.

Lösungsmittel	Temperatur	Base/	Katalysator
Aceton	70 °C	K_2CO_3	–
Aceton	70 °C	K_2CO_3	KI
DMF	80 - 100 °C	K_2CO_3	–
DMF	80 °C	K_2CO_3	KI

Der Ansatz wurde mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt und der Fortschritt mittels DC kontrolliert. Es konnte nur eine langsame Umsetzung beobachtet werden, die vor allem daran lag, dass der Methylester **64** auch in der Hitze in Aceton nur wenig löslich war. Vom Reaktionsgemisch wurde ein Massenspektrum angefertigt, um die Entstehung des Produkts zu kontrollieren. Im Spektrum konnte neben den

Signalen der Edukte **64** und **45** noch ein neues Massensignal bei 550 beobachtet werden, welches der Masse des Produkts **65** entsprach. Um eine höhere und schnellere Umsetzung zum Produkt zu erhalten, wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet. In den Publikationen wurde für die Williamson-Ethersynthese DMF als Lösungsmittel sowie Natriumiodid als Katalysator verwendet [110, 115, 116]. Die getesteten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Auch mit veränderten Reaktionsbedingungen konnte keine Steigerung der Umsetzung beobachtet werden.



Schema 3.27: Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogen **65**. a) Ethanol, H_2SO_4 , 16 h Rückfl. b) 1,5-Dibrompentan (**51**), Acetonitril, K_2CO_3 . c) DMF, K_2CO_3 , 80°C , 16 h.

Parallel zu den oben genannten Reaktionen wurde noch ein anderer Syntheseweg eingeschlagen, um das Fluorescein-Pentamidin-Analogen mit einer Etherverknüpfung **63** zu erhalten (Schema 3.27). Hierbei wurde zunächst 1,5-Dibrompentan (**51**) mit der Hydroxygruppe des Fluoresceins **66** verethert. Das Reaktionsgemisch wurde massenspektrometrisch analysiert und neben dem Produktpeak wurden zusätzlich zwei weitere Peaks bei 659 und 789 beobachtet. Die Masse bei 789 entspricht dem symmetrischen Molekül bei zweifacher Veretherung. Das einfach veretherte Produkt **67** konnte nach säulenchromatografischer Reinigung mit einer Ausbeute von 36 % erhalten werden. Anschließend wurde die Verbindung **67** mit den käuflich erworbenen 4-Hydroxybenzamidin (**68**) umgesetzt. Die massenspektrometrische Analyse des Reaktionsgemisches ergab die richtige Masse bei 564. Zusätzlich wurden noch

zwei weitere Massen bei 536 und 519 gefunden, wobei das Nebenprodukt bei 519 am meisten entstanden war. Die Masse bei 536 entspricht dem Molekül, bei dem die Ethylgruppe unter den gegebenen basischen Bedingungen abgespalten wurde. Zwar sind laut den Massenspektren die beiden Produkte **69** und **63** entstanden, aber die Produkte konnten säulenchromatografisch nicht isoliert werden. Nach der Reinigung wurde zwar ein Feststoff erhalten, der allerdings laut Massenspektrum die Masse 519 hatte.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine

Für den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine benötigt man eine Transfer-RNA, die folgende Eigenschaften erfüllen sollte:

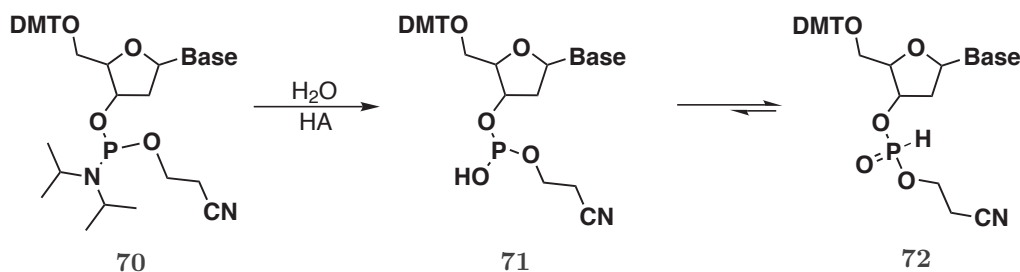
1. Nach Abgabe der unnatürlichen Aminosäure sollte diese nicht von einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase erkannt werden und mit einer falschen (natürlichen Aminosäure) erneut beladen werden.
2. Sie sollte ein Anticodon tragen, das für keine natürliche Aminosäure kodiert.

Die Methode zur Herstellung einer solchen tRNA existiert seit 1989 und wurde durch Robertson *et al.* [30] erstmals beschrieben. Die tRNA besteht aus zwei Bausteinen, einem Dinukleotid und einer verkürzten tRNA(-CA). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Herstellung der beiden Bausteine im Arbeitskreis etabliert werden.

4.1.1 Synthese des Dinukleotids und der unnatürlichen Aminosäure

Zur Synthese des Dinukleotids **1** wurden bereits viele Publikationen veröffentlicht [117, 118, 119]. Die Unterschiede der Synthesen bestehen in den verwendeten Schutzgruppen und Kopplungsreagenzien. Um den schnellsten und effektivsten Weg zur Synthese des Dinukleotids **1** zu erhalten, wurden am Anfang mehrere kleinere Ansätze mit unterschiedlichen Schutzgruppen und Kopplungsreagenzien durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsgemische massenspektrometrisch untersucht. Von Vorteil war, dass die kommerziell erhältlichen Cytidin-Phosphoramidite mit unter-

schiedlichen Schutzgruppen (**6**, **7**, **8**) bereits zur Verfügung standen. Diese wurden für die Primersynthese verwendet. Der zweite Baustein, das benzoylgeschützte Adenosin **5**, konnte in drei Stufen hergestellt werden. Kritisch war der Kopplungsschritt zwischen den Cytidin-Phosphoramiditen **6**, **7**, **8** und dem Adenosin **5**. Da alle Cytidin-Phosphoramidite bereits vorher für eine Dinukleotid Synthese eingesetzt wurden, sollte die Kopplung mit allen Edukten möglich sein und auch überall die Produktmasse im Massenspektrum vorzufinden sein. Entgegen der Erwartung erfolgte eine Umsetzung zum gewünschten Produkt nur mit dem Kopplungsreagenz Benzylmercaptotetrazol **11**. Eine Reaktion konnte nur bei dem acetyl- und benzoylgeschützten Cytidin-Phosphoramiditen **7** und **8** beobachtet werden. Im Gegensatz zum Benzylmercaptotetrazol (**11**) liegt Aktivator 42 (**10**) als Lösung in Acetonitril vor. Durch längeres Lagern hatte die Lösung vermutlich Wasser gezogen und dadurch die Kopplungsreaktion zwischen dem Phosphoramidit und dem Adenosin verhindert. Allgemein wird die Reaktion in trockenem Lösungsmittel sowie unter Schutzgas durchgeführt. Ist Wasser vorhanden, kann es ebenfalls als Nukleophil agieren, und als Nebenprodukt entsteht ein H-Phosphonat-Diester **72** (Schema 4.1). Bei genauerer Betrachtung der ESI-Massenspektren der Reaktionsgemische, bei dem Aktivator 42 (**10**) eingesetzt wurde, konnten die Massen der einzelnen unterschiedlich geschützten Phosphonate beobachtet werden. Warum das Tac-geschützte Cytidin



Schema 4.1: Entstehung eines H-Phosphonat-Diesters **72** mit H₂O als Nukleophil.

6 auch mit Benzylmercaptotetrazol (**11**) nicht umgesetzt wurde, könnte am Edukt selbst liegen, welches sich durch längere Lagerung zersetzt hatte. Letztendlich wurde für die Synthese das benzoylgeschützte Cytidin **8** verwendet, da das Adenosin **5** ebenfalls mit dieser Schutzgruppe versehen ist und die Analytik später nicht durch eine weitere Schutzgruppe erschwert wird. Die weiteren Syntheseschritte zum geschützten Dinukleotid **17** verliefen ohne Schwierigkeiten und die gewünschten Produkte konnten alle säulenchromatografisch gereinigt und isoliert werden. Im nächsten Schritt war es wichtig, dass die Entschützung vollständig verlief. Wird die Phosphatgruppe

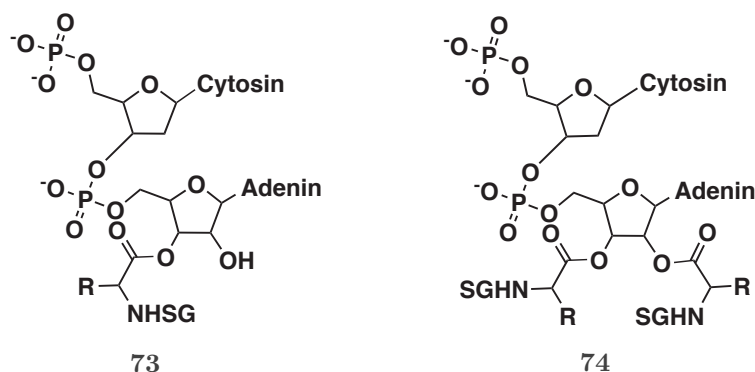
nicht entschützt, kann das Dinukleotid nicht mit der verkürzten tRNA ligiert werden. Werden die Hydroxygruppen nicht entschützt, kann die Veresterung mit der unnatürlichen Aminosäure nicht stattfinden. Zunächst müssen beide Benzoylgruppen an der 2' und 3' Position abgespalten werden, da nicht sicher ist, an welcher Position sich die Aminosäure befindet, wenn diese in ein Protein eingebaut wird. Zwischen den beiden Hydroxygruppen herrscht ein Gleichgewicht und die Aminosäure wandert zwischen der 2' und 3' Position hin und her (Transacylierung) [120]. Für die Entschätzung wurden drei Bedingungen getestet. Letztendlich wurden in jedem Ansatz nicht vollständig entschütztes Produkt im Massenspektrum nachgewiesen. Die unvollständige Entschätzung könnte an einer zu kurzen Reaktionsdauer liegen. Da das Produkt **1** wasserlöslich ist, konnte es mit Wasser ausgeschüttelt und durch Gefriertrocknung als Pulver erhalten werden.

Parallel zu der Synthese des Dinukleotids **1** wurden auch die kommerziell erhältlichen unnatürlichen Aminosäuren 4-Iod-L-phenylalanin (**18**) und 4-Methoxy-L-phenylalanin (**19**) geschützt und aktiviert. Auch hier wurden schon mehrfach unterschiedliche Schutzgruppen für die Aminogruppe und unterschiedliche Aktivierungsreagenzien für die Carboxylgruppe der Aminosäure publiziert. Die geschützte Aminosäure wird häufig als Cyanomethylester aktiviert. Als Schutzgruppen werden hauptsächlich die [(2-Nitroveratryl)oxy]carbonyl-Gruppe (NVOC) und die 4-Pentenoylgruppe verwendet. Erstere ist eine photolabile Gruppe und kann durch Lichteinstrahlung abgespalten werden. Die 4-Pentenoylgruppe wird unter milden Bedingungen chemisch abgespalten. Die unnatürlichen Aminosäuren 4-Iod-L-phenylalanin (**18**) und 4-Methoxy-L-phenylalanin (**19**) wurden in dieser Arbeit mit der Pentenoylgruppe geschützt und als Cyanomethylester aktiviert. Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von Lodder *et al.* [88] durchgeführt. Die Synthesen erfolgten in guten Ausbeuten.

HPLC-Analytik

Die Synthesen des Dinukleotids **1** und der unnatürlichen Aminosäure und **19** konnten erfolgreich durchgeführt werden. Danach erfolgte die Veresterung der beiden Komponenten. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels *reverse* HPLC kontrolliert. Da die Zusammensetzung des Fließmittels schon gegeben war, konnte die Methode schnell entwickelt werden [88]. Wie erwartet wurde pdCpA **1** zuerst eluiert und die aktivierte Aminosäure zuletzt. Das acylierte Produkt **73** sollte zwischen pdCpA **1** und der aktivierten Aminosäure **19** erscheinen (Abbildung 3.5). Im Chro-

matogramm wurden allerdings zwei Signale beobachtet ($t = 22,005$ min und $t = 27,496$ min), die dem acylierten Produkt **73** entsprechen könnten. Um Verschmutzungen und Zerfallsprodukte kann es sich dabei nicht handeln, da die Signale zu intensiv sind und die Edukte zuvor auf Reinheit getestet wurden. Die zwei Signale sind durch die Entstehung des einfach **73** und zweifach acylierten Produktes **74** zu erklären (Schema 4.2). Da die Aminosäure **19** im fünffachen Überschuss hinzugefügt wurde, ist die Wahrscheinlichkeit recht groß, dass zwei Aminosäuren mit einem Molekül Dinukleotid reagierten. Die Arbeitsgruppe um Hecht hat neben den einfach acylierten Dinukleotiden auch bisaminoacylierte Dinukleotide mit einer verkürzten tRNA ligiert und diese anschließend untersucht [121]. Die Ergebnisse zeigen, dass das bisaminoacylierte Produkt erst nach dem einfach acylierten Produkt eluiert wurde [122]. Daher würde das Signal bei $t = 22,005$ min dem einfach acylierten Produkt **73** und das Signal bei $t = 27,496$ min dem bisaminoacylierten Dinukleotid **74** entsprechen. Allerdings entstehen dadurch für die spätere tRNA-Synthese sowie für den Einbau der unnatürlichen Aminosäure in Proteine keine Probleme. Untersuchungen der Hecht-Gruppe haben ergeben, dass in der zellfreien Synthese beide Aminosäuren eingebaut werden [123]. Von der bisaminoacylierten tRNA wird zunächst eine unnatürliche Aminosäure in das Protein eingebaut, wobei eine monoacylierte tRNA entsteht, die das Ribosomen wieder verlässt. In einem erneuten Syntheseyklus wird dann die zweite Aminosäure in das nächste Protein eingebaut.



Schema 4.2: Struktur des acylierten **73** und bisaminoacylierten Dinukleotids **74**. SG steht für Schutzgruppe.

4.1.2 Synthese der verkürzten tRNA

Die Herstellung der verkürzten tRNA wurde schon vielfach in der Literatur beschrieben [18, 89]. Als tRNA-Sequenz wurde eine tRNA aus *Tetrahymena thermophila* gewählt. Vorteil dieser tRNA ist, dass sie als Anticodon "TAG" trägt und dass dieses nicht für "Stop" codiert (wie z. B. in *E. coli*), sondern für eine Aminosäure. Somit ist die tRNA-Sequenz schon vorhanden und es muss keine Anticodon-Mutation von einer anderen tRNA durchgeführt werden. Gleichzeitig ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass eine tRNA aus einem anderen Organismus von einer aminoacyl-tRNA-Synthetase aus einem *E. coli*-System erkannt wird. Die tRNA aus *T. thermophila* wurde auch schon für den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine eingesetzt [90]. Weiterhin wurde berichtet, dass im Gegensatz zu anderen tRNAs aus anderen Organismen, wie zum Beispiel aus Hefen oder *E. coli*., der Einbau einer unnatürlichen Aminosäure etwa 4 - 10× effizienter war. Allerdings erfolgte die Proteinsynthese nicht *in vitro*, sondern *in vivo* in Oocyten. Transfer-RNAs aus *T. thermophila* wurden aber auch *in vitro* getestet und ebenfalls mit tRNAs aus anderen Organismen verglichen. Dabei kam heraus, dass die Effizienzen des Aminosäureeinbaus mit den verschiedenen tRNAs kaum Unterschiede zeigen [22]. Da tRNAs aus *T. thermophila* in beiden Systemen *in vivo* sowie *in vitro* funktionieren, ist es von Vorteil diese tRNA herzustellen. Die tRNA konnte, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben erfolgreich hergestellt werden. Wichtig für die Synthese war, dass die DNA-Linearisierung vollständig verlief, da sonst zu viele unterschiedlich große RNA-Fragmente entstehen würden und die Ausbeute an tRNA(-CA) vermindert werden würde. Anfängliche Schwierigkeiten, um den vollständigen Verdau zu kontrollieren, wurden einfach durch Erhitzen der Probe und Zugabe von SDS gelöst. Der zweite kritische Schritt war der Transkriptionsansatz. Zunächst musste eine hohe Ausbeute an RNA hergestellt werden, da anschließend noch mehrere Präzipitations- und Reinigungsschritte erfolgten, bei denen ein Großteil der RNA verloren ging. Anfangs konnte auch keine RNA in den Gelen nachgewiesen werden, obwohl die DNA vollständig verdaut war. Gründe dafür könnten sein, dass die T7-RNA-Polymerase nicht funktionell war oder dass die RNA in so geringer Konzentration hergestellt wurde, dass sie nicht mehr nachweisbar war. Eine Kontamination der Utensilien mit RNAsen konnte ausgeschlossen werden, da der verwendete Marker ein ssRNA-Marker war und nicht abgebaut wurde. Von der Polymerase wurde eine neue Charge verwendet, um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass sie nicht mehr aktiv war. Bei

der Linearisierung der DNA entstehen insgesamt sechs Fragmente, weil die DNA die Schnittstelle für das Enzym fünfmal enthält. Nur eins der Fragmente trägt die Erkennungssequenz für die T7-RNA-Polymerase. Das bedeutet nur 1/6 der eingesetzten DNA hat die richtige Sequenz. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die linearisierte *template*-DNA nicht in ausreichender Menge vorlag, sodass die RNA-Synthese minimiert wurde. Die DNA Menge wurde verdreifacht und in den RNA-Gelen konnte die tRNA(-CA) nachgewiesen werden.

4.1.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die verkürzte tRNA(-CA) molekularbiologisch und das Dinukleotid in einer siebenstufigen Synthese chemisch hergestellt werden. Erste Ansätze zur Acylierung des Dinukleotids mit der unnatürlichen Aminosäure 4-Methoxy-L-phenylalanin wurden bereits durchgeführt. Zur Analyse der Reaktionsmischung wurde eine analytische HPLC-Methode entwickelt.

Der nächste Schritt wäre es, die entstandenen Produkte zu isolieren und mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie zu analysieren. Damit die Ligation mit der verkürzten tRNA(-CA) erfolgen kann, muss das acylierte Dinukleotid eine hohe Reinheit besitzen. Verunreinigungen könnten die Ligation stark beeinflussen oder verhindern. Daher ist es unerlässlich das acylierte Dinukleotid über eine semipräparative HPLC zu reinigen und eine neue Methode dafür zu entwickeln. Die Ligation der beiden Komponenten ist bereits vielfach beschrieben und ob die vollständige tRNA_{CUA}^{uaa} entstanden ist, kann mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese festgestellt werden. Nach Entschützung der tRNA_{CUA}^{uaa} kann diese in der zellfreien Synthese von GFP getestet werden. Die beiden verwendeten unnatürlichen Aminosäuren, aber auch viele andere, wurden bereits in GFP eingebaut [87, 124]. Ein erfolgter Einbau der unnatürlichen Aminosäure verursacht eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums, da diese durch den Substituenten in *para*-Stellung, das Fluorophor beeinflusst. Es besteht immer die Möglichkeit, dass die tRNA von einer tRNA-Synthetase erkannt und mit einer natürlichen Aminosäure erneut beladen wird. Somit ist die Fluoreszenzmessung eine gute Methode um die Effizienz des Einbaus der unnatürlichen Aminosäure zu bestimmen.

4.2 Zellfreie Synthese mit Amphipolen

In der zellfreien Proteinsynthese können Detergenzien in den Ansatz gegeben werden, um Membranproteine zu solubilisieren. Fallen die Proteine aus, können sie zwar wieder resolubilisiert werden, allerdings erhält man sie häufig mit der falschen Faltung und somit inaktiv. Im Arbeitskreis werden hauptsächlich Detergenzien verwendet, die aus der Brij-Familie stammen und ein paar andere, die häufig in der zellfreien Synthese eingesetzt werden. Eine Gemeinsamkeit dieser Detergenzien ist, dass sie Mizellen ausbilden. Es ist bekannt, dass nicht alle Proteine mit den Detergenzien in der zellfreien Synthese hergestellt werden können [125]. Teilweise wird auch eine große Menge an Protein hergestellt, diese zeigen jedoch keine Aktivität. Detergenzien tendieren zur Inaktivierung des Proteins, da diese weniger gut stabilisiert werden [50]. Damit mehr Substanzen für die zellfreie Synthese zur Verfügung stehen, vor allem solche, die einen anderen Mechanismus zur Solubilisierung von Membranproteinen besitzen, sollten kommerziell erhältliche Amphipole (Abbildung 3.9) untersucht werden.

4.2.1 Untersuchungen von Amphipolen in der analytischen zellfreien Proteinsynthese

Die untersuchten Proteine *PfAQP*, *EcFokA*, *rUT-B* und der M2-Kanal sind zur Faltungskontrolle mit GFP fusioniert, deshalb wurden die Amphipole in der zellfreien Synthese vom löslichen GFP getestet. Damit konnte kontrolliert werden, ob die Amphipole generell die Transkriptions/Translations-Maschinerie stören (Abbildung 3.10). Die Amphipole wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, da nach Klammt *et al.* eine höhere Konzentration an PMAL-C12 die GFP-Produktion hemmt [92]. Weder bei der niedrigen noch bei der hohen Konzentration konnte bei A8-35 eine GFP-Herstellung beobachtet werden. Dies ist erstaunlich, da andere Untersuchungen ergeben haben, dass GFP bei Anwesenheit von A8-35 produziert wurde. Zudem wurde auch ein membranständiges Protein in Gegenwart von A8-35 hergestellt [91]. A8-35 wurde neben der Synthese von GFP auch bei der Synthese von *PfAQP*, einem membranständigen Protein, eingesetzt (Abbildung 3.11). Auch hier wurde keine Proteinproduktion beobachtet. Im Allgemeinen werden geladene Detergenzien vom zellfreien System weniger toleriert. Und da A8-35 ein anioni-

ches Amphipol ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei genauso verhält. Andere Ergebnisse lieferten hingegen die PMAL-Amphipole. Eine interessante Beobachtung ist, dass in PMAL-C8 sowohl GFP als auch *PfAQP* hergestellt werden konnten und zwar bei beiden der eingesetzten Konzentrationen. In PMAL-C12 und C16 wurde GFP nur bei der niedrigen Konzentration hergestellt und *PfAQP* konnte nicht nachgewiesen werden. Wie bereits festgestellt wurde, inhibiert eine höhere Konzentration an PMAL-C12 die Proteinsynthese. Daraus ergab sich die Erwartung, dass sich die beiden anderen PMALs ähnlich verhalten würden, weil sie sich nicht sonderlich voneinander unterscheiden. Die PMALs sind Polymere und haben alle eine zwitterionische Struktur. Die Einzelmoleküle unterscheiden sich strukturell nur in der Länge ihrer Seitenketten. Die kürzeste Seitenkette hat PMAL-C8 mit acht Kohlenstoffatomen. Ein weiterer Unterschied ist die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten, die die Größe der PMALs bestimmen. Die Größenspanne der drei PMALs liegt zwischen 12 - 39 kDa. Die Größe hat vermutlich weniger Einfluss auf die Synthese, denn PMAL-C8 liegt mit 18 kDa zwischen dem kleineren PMAL-C12 (12 kDa) und dem größeren PMAL-C16 (39 kDa). Warum es bei PMAL-C8 gut funktioniert und es bei C12 und C16 nicht der Fall ist, kann nur spekuliert werden. Beobachtungen ergaben, dass kein *PfAQP* beim Fehlen eines Detergens produziert wurde. Daher wurde vermutet, dass ein Teil des Proteins während es sich noch im Ribosomen befindet, bereits solubilisiert wird [43, 46, 125]. Dies führt zu der Annahme, dass die Amphipole schon während der Translation von *PfAQP* an der hydrophoben Oberfläche des entstehenden Proteins adsorbiert wird. Wahrscheinlich spielt die Struktur des Einzelmoleküls hier eine Rolle. Da die Seitenketten die flexibelsten Komponenten sind, ist es möglich, dass diese in die Maschinerie hineinragen und die Translation von *PfAQP* inhibieren. Nur eine Kettenlänge von acht Kohlenstoffatomen wird toleriert.

Von den vier getesteten Amphipolen war PMAL-C8 mit dem zellfreien System am besten kompatibel.

4.2.2 Analytische zellfreie Synthese von unterschiedlichen Kanalproteinen mit PMAL-C8

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nur PMAL-C8 in der zellfreien Synthese eingesetzt und mit Detergenzien aus der Brij-Familie verglichen. Hierfür wurden drei

Proteine ausgewählt, die schon im Arbeitskreis in der zellfreien Synthese hergestellt wurden. Sie stammen aus unterschiedlichen Organismen und sind unterschiedlich aufgebaut. Alle drei Proteine besaßen die höchste Proteinausbeute mit der richtigen Faltung in einem Detergens aus der Brij-Familie (Abbildung 3.12). Insgesamt ist PMAL-C8 bei den hier durchgeführten Synthesen nicht schlechter oder besser. Die Proteine wurden nach der Synthese immer einer *His-tag*-Reinigung unterzogen. Um den Einfluss von Amphipolen auf die *His-tag*-Reinigung zu untersuchen, wurde das Reinigungsprotokoll, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben angepasst. Der Veröffentlichung von Zoonens *et al.* zufolge, könnte es sich negativ auf die Bindung an der Säule auswirken, wenn sich der *His-tag* zu nah an der transmembranen Region befindet [58]. Durch die hohe Affinität des Amphipols an die Oberfläche des Proteins entstehen Membranprotein/Amphipol Komplexe. Es ist nicht sicher, wie stark die Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem Amphipol ist. Vor allem ist unklar, wo sie sich genau befindet und eventuell den *His-tag* daran hindert an die Nickelsäule zu binden. Eine Störung der *His-tag*-Reinigung bei den untersuchten Proteinen wurde nicht beobachtet. Der *His-tag* befindet sich in den untersuchten Proteinen am C-terminalen und nicht, wie in Zoonens *et al.* [58], beschrieben am N-terminalen Ende. Zusätzlich befindet sich das GFP zwischen dem Protein und dem *His-tag*, daher ist es von der transmembranen Region weit genug entfernt.

Weiterhin ist bekannt, dass eine Rückfaltung in die native Form in Amphipolen effektiver als in gängige Detergenzien ist, nachdem das Protein ausgefallen ist [55, 126]. Hier stellt sich die Frage, ob diese Eigenschaft sich positiv auf das Verhältnis zwischen dem falsch und dem richtig gefalteten Protein auswirken könnte. Der Gedanke hierbei ist, dass die falsch gefalteten Proteine, die in der zellfreien Synthese entstehen, während der *His-tag* Reinigung die Rückfaltung in die native Form förderten und somit die Ausbeute erhöhten. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen dem DDM- und PMAL-gereinigten Proben festgestellt werden. Dass eine Rückfaltung in die native Form stattfindet, ist von vielen Faktoren (Zeit, Temperatur, Protein/Amphipol *ratio*) abhängig. Alle Faktoren für die hergestellten Proteine zu testen wäre zu zeitaufwendig. Zumal das eigentliche Ziel hierbei ist, andere Substanzen für die zellfreie Synthese zu testen. Ein positiver Nebeneffekt wäre, wenn dabei die Ausbeute an richtig gefaltetem Protein nach einer *His-tag* Reinigung zusätzlich erhöht würde.

4.2.3 Präparative zellfreie Synthese

Verschiedene Membranproteine können in PMAL-C8 hergestellt werden. Der nächste Schritt ist die Funktionstestung der hergestellten Proteine. Im Arbeitskreis werden hauptsächlich Kanalproteine zellfrei hergestellt und anschließend in Liposomen eingebaut, um sie danach mit einer geeigneten Messmethode zu untersuchen. In Pocan-schi *et al.* wurde berichtet, dass zwei in A8-35 solubilisierete Proteine in einer *Black Lipid Membrane* eingebaut werden konnten und diese auch funktionell waren [127]. Daher sollte es auch möglich sein, in Amphipol hergestellte Kanalproteine in Liposomen einzubauen. Für die Untersuchung wurde der M2-Kanal aus dem Influenza Virus gewählt. Die Wahl fiel auf dieses Protein, weil dieses im Arbeitskreis bereits erfolgreich durch S. Bock funktionell in Liposomen eingebaut wurde. Protonenleitfähigkeit konnte am SURFE²R nachgewiesen werden und eine Inhibition durch Amantadin wurde ebenfalls gezeigt. Daraus ergab sich die Frage, ob sich das bestehende Rekonstitutionsprotokoll auch auf PMAL-C8 übertragen lässt. Letztendlich musste das Protokoll etwas verändert werden, damit das in PMAL-C8 hergestellte Protein auch in Liposomen eingebaut wurde. Schwierigkeiten entstanden bereits bei der Bestimmung des Proteingehaltes mit dem Bradford-Reagenz. Es ist bekannt, dass Detergenzien diesen Test stören. Trotzdem kann eine Proteinbestimmung durchgeführt werden, indem sie mit einer festen Konzentration des verwendeten Detergens kalibriert wird. Mit PMAL-C8 konnte eine Bestimmung nicht durchgeführt werden, da eine intensive Blaufärbung der Lösung schon mit der Kalibrierlösung entstand. Mit der Protein/PMAL-C8 Lösung war eine Messung nicht durchführbar. Dass PMAL-C8 stärker stört ist logisch zu erklären. Der Test funktioniert so, dass ein Triphenylmethanfarbstoff (z. B. *Coomassie Brilliant Blue G250*) unter sauren Bedingungen mit kationischen und unpolaren Seitenketten des Proteins einen blauen Komplex bildet. Wenn man sich die Struktur von PMAL anschaut, enthält es eine kationische Funktion sowie unpolare Gruppen und kann mit dem Farbstoff einen Komplex bilden. Anfangs konnten auch keine Proteoliposomen hergestellt werden, sobald sich PMAL-C8 im Reinigungspuffer II befand (Abbildung 3.16). Schnell stellte sich heraus, dass während des Konzentrierungsschrittes nicht nur das Protein, sondern auch PMAL-C8 konzentriert wurde. Die Zentrifugationsfilter, die verwendet wurden besaßen einen *cut off* von 10 kDa und mit einer Masse von 18 kDa konnte PMAL-C8 diesen nicht passieren. Ein weiterer Hinweis dafür war die intensiv gefärbte Spur im Coomassie-Gel nach der Konzentrierung. Vermutlich störte eine

hohe Konzentration an PMAL-C8 die Bildung von Proteoliposomen. Da PMAL-C8 nicht durch *Biobeads* adsorbiert wurde, bestand noch eine hohe Konzentration in der Lösung. Die verwendeten *Biobeads* sind makroporöse, mit Divinylbenzol vernetzte Polystyrolkugeln. Durch die hohe Oberfläche können hydrophobe Substanzen aus einer wässrigen Lösung adsorbiert und entfernt werden. Die durchschnittliche Porendurchmesser beträgt 90 Å [128]. Da Amphipole größer sind, werden diese nicht adsorbiert und verbleiben in der Lösung [55]. Vermutlich reichte der anschließende Zentrifugationsschritt nicht aus, um überschüssiges Amphipol zu entfernen. Dass eine erhöhte Amphipolkonzentration die Bildung von Proteoliposomen behindert, wird zusätzlich durch folgende Punkte unterstützt: 1. Nachdem PMAL-C8 aus dem Reinigungspuffer entfernt wurde, verschwand die intensive Färbung im Coomassie-Gel. 2. Im Gegensatz zum ersten Versuch befand sich nun weniger PMAL-C8 in der Lösung. Insbesondere konnte ein Einbau von Protein in Liposomen beobachtet werden (Abbildung 3.17).

4.2.4 Funktionstestung des in PMAL-C8 hergestellten M2-Kanals am SURFE²R

Durch SURFE²R-Messungen konnte Protonenleitfähigkeit in allen Proben nachgewiesen werden. Daher war die Annahme, dass sowohl in Brij78 und PMAL-C8 hergestelltes M2-GFP funktionell waren. Wenn M2-GFP richtig ausgebildet wird, dann sollte diese auch durch Amantadin inhibiert werden können. Allerdings konnte nur in Brij78/DDM hergestelltes M2 inhibiert werden. Der M2-Kanal in anderen Proben, wo PMAL-C8 vorhanden war, sei es während der zellfreien Synthese oder nach der Reinigung hinzugefügt, wurden nicht durch Amantadin inhibiert. Entweder ist der Kanal nicht richtig ausgebildet worden oder PMAL-C8 verhinderte die Bindung des Amantadins an M2.

Die Struktur des M2-Kanals wurde bereits aufgeklärt. Demnach ist der M2-Kanal ein Homotetramer und existiert in einer offenen und einer geschlossenen Form. Der *Gating*-Mechanismus ist pH-abhängig und unter sauren Bedingungen ist der Kanal geöffnet. Die Inhibition des Kanals erfolgt durch die Bindung von vier Amantadinen an die Bindetaschen, die sich am Poreneingang befinden. Durch die Bindung der Amantadine wird die geschlossene Form stabilisiert und eine Inhibition erzeugt [129]. Dass der Kanal nicht ausgebildet wurde ist eher unwahrscheinlich, denn dann

könnte keine Protonenleitfähigkeit gemessen werden. Auch ist die Protein-Amphipol-Wechselwirkung schwächer als die Protein-Protein-Wechselwirkung [50]. Dass überschüssiges PMAL-C8 die Bindung des Amantadins stört, ist wahrscheinlicher. Vermutlich wird Amantadin aufgrund seiner Hydrophobizität selbst vom Amphipol adsorbiert und somit daran gehindert an die Bindetaschen zu gelangen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich PMAL-C8 am C-terminalen Ende anlagert, welches sich in der Nähe des Poreneingangs und somit in der Nähe der Bindetaschen befindet, und die Amantadine sterisch daran gehindert werden an die Bindetaschen zu gelangen.

4.2.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnten unterschiedliche Membranproteine in PMAL-C8 zellfreien hergestellt werden. Teilweise mit besseren Ausbeuten an richtig gefaltetes Protein, als in einem Detergenz aus der Brij-Familie. Das Reinigungs- sowie Rekonstitutionsprotokoll konnte soweit verbessert werden, dass auch ein Einbau von Membranprotein (M2-GFP) in Liposomen beobachtet werden konnte. Der M2-Kanal zeigte Protonenleitfähigkeit, aber eine Inhibition durch Amantadin konnte nicht erreicht werden. Damit die Funktionsuntersuchung vom M2-Kanal abgeschlossen werden kann, müsste überschüssiges PMAL-C8 aus der Lösung entfernt werden. Hier könnte als erster Ansatz ein zusätzlicher Wasch- und Zentrifugationsschritt nach Behandlung mit den *Biobeads* eingeführt werden, damit das Amphipol besser entfernt wird.

Eine weitere Methode zur Funktionstestung von Kanalproteinen, die bereits im Arbeitskreis etabliert wurde, ist die dynamische Lichtstreuungsmessung an einer *Stopped-flow* Apparatur. Hier könnten auch andere in PMAL-C8 hergestellten Proteine mit einem anderen System getestet werden. Generell ist der Einsatz von zwitterionischen Substanzen nicht unbedingt von Vorteil, da sie entweder die zellfreie Synthese und wenn sie nicht komplett entfernt werden, auch die Funktionstestung stören könnten. Seit einigen Jahren werden in der Arbeitsgruppe um Popot nichtionische Amphipole (NApol) entwickelt. Sie sind kompatibel mit dem zellfreien System und konnten bei der Synthese von Bacteriorhodopsin eine höhere Ausbeute erzielen als in einem Detergens [93]. Sollten NApole irgendwann kommerziell erhältlich sein, ist es sicherlich von Vorteil diese zu testen, um weitere Substanzen zu erhalten, die in der zellfreien Synthese eingesetzt werden können.

4.3 Untersuchung der Pentamidinaufnahme in *Trypanosoma brucei*

Die Pentamidinaufnahme in *Trypanosoma brucei* wurde durch die Arbeitsgruppe um D. Horn in direkten Zusammenhang mit *TbAQP2* gebracht [71, 84]. Sie postulierten, dass aufgrund des ungewöhnlichen Selektivitätsfilters von *TbAQP2* eine Pentamidinleitfähigkeit besteht. *TbAQP2* besitzt ein NPA/NPS-Motiv und in der ar/R-Region ist das Arginin durch ein Leucin ausgetauscht. Unserer Theorie zufolge reicht der Austausch des Arginins durch Leucin in der ar/R-Region nicht aus, damit Pentamidin geleitet wird. Pentamidin ist geladen und mit einer Masse von 340 kDa dreimal größer als Glycerol mit einer Masse von 92 kDa (Abbildung 3.18). Selbst wenn das Pentamidin die ar/R-Region passieren würde, gibt es noch die NPA-Region, die immer noch funktionell gegen Kationen ist [77]. Entgegen der Aussage von D. Horn, konnte eine direkte Passage von Pentamidin durch *TbAQP2* nicht bestätigt werden. Im Gegenteil konnte eine sehr gute Inhibition der Glycerolleitfähigkeit durch Pentamidin festgestellt werden (Kapitel 3.3.1). Die Inhibition der Glycerolleitfähigkeit lässt sich anhand der Vergleichs der Modelle der Aquaglyceroporine aus *E. coli* (*EcGlpF*) und aus *T. brucei* (*TbAQP2*) in Abbildung 4.1 erklären. Durch den Verlust der Seitenkette des Arginins entsteht eine Art Tasche im ar/R Bereich. Durch die Vergrößerung in diesem Bereich, kann sich der aromatische Ring am Pentamidin einlagern. Zusätzlich weist *TbAQP2* eine weitere Besonderheit durch die Aminosäure Aspartat (D265) auf. Es ist bis jetzt das einzige Aquaglyceroporin, bei dem noch ein Aspartat vorhanden, die ar/R-Region aber verändert ist. Unter physiologischen Bedingungen ist das Aspartat deprotoniert und das Pentamidin protoniert. Unserer Theorie zufolge, erfolgt die Inhibition durch die Bindung des positiven Pentamidins an die Tasche. Die Bindung wird zusätzlich durch ionische Wechselwirkung mit der negativen Ladung des Aspartats verstärkt (Abbildung 4.1).

Eine pH-abhängige Glycerolleitfähigkeitsmessung gab einen Hinweis darauf, dass diese ionische Wechselwirkung zwischen dem Aspartat und dem Pentamidin für die Bindung wichtig ist. Die Messungen wurden bei pH 7,2, pH 3,5 und 2,5 durchgeführt. Mit einem pK_s -Wert von 3,9 wird ein Teil des Aspartats protoniert und führt zu einer Abschwächung der Bindung von Pentamidin. Erfolgt die Messung im noch acideren Bereich ist nur noch Asparaginsäure vorhanden und das Pentamidin kann keine ionische Bindung ausbilden. Diese Abschwächung spiegelt sich auch in den IC_{50} -Werten wider, die sich vom nanomolaren (bei physiologischen pH) bis in den

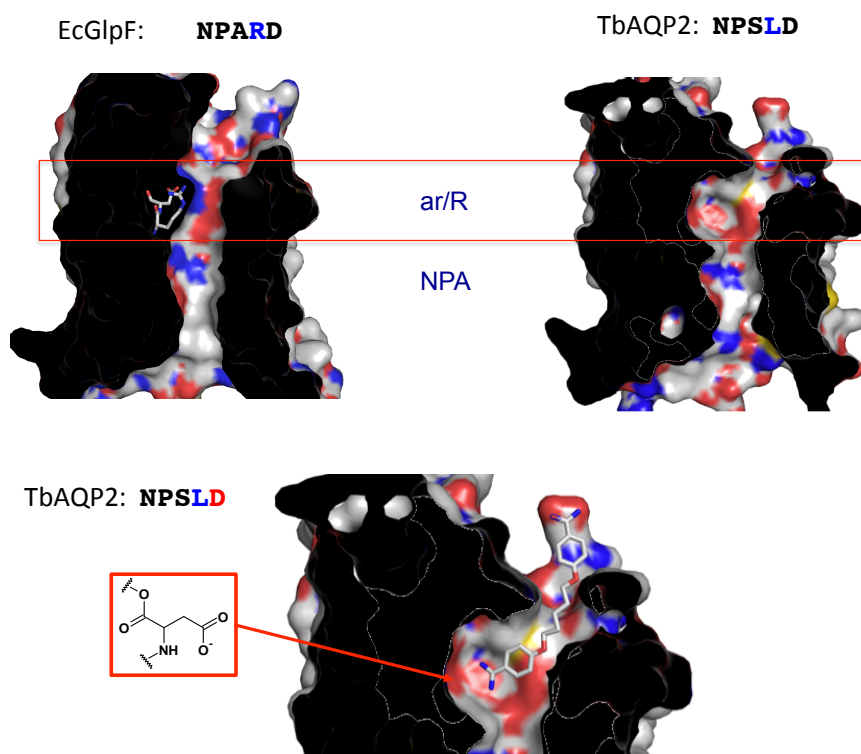


Abbildung 4.1: Oben: Vergleich von *EcGlpF* und *TbAQP2*. Die ar/R-Region ist durch den roten Kasten gekennzeichnet. Unten: Modell für die Bindung des Pentamidins in der Tasche. Im roten Kasten ist die Seitenkette von Aspartat dargestellt, die mit ihrer negativen Ladung in Richtung der Tasche zeigt.

mikromolaren (bei pH 2,5) Bereich verschob. Selbstverständlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Aminosäuren protoniert werden, die eventuell die Bindung des Pentamidins beeinflussen. Eine Möglichkeit diese Aussage zu festigen, ist das Aspartat zu einer ungeladenen Aminosäure zu mutieren und die Messungen zu wiederholen.

In einer Publikation von Matovu *et al.* wurde neben dem Pentamidin auch Propamidin getestet. Der IC_{50} -Wert von Propamidin war $13\times$ höher als der des Pentamidins [70]. Beide Substanzen sind Diamidine, dessen einziger Unterschied die Kettenlänge zwischen den Benzamidin-Gruppen ist. Welche Strukturmerkmale am Pentamidin spielen eine Rolle, so dass eine gute Bindung an *TbAQP2* erzeugt wird? Zur Klärung dieser Frage wurden unterschiedliche Pentamidin-Analoga (Schema 3.9) getestet. Die Ergebnisse ergaben, dass die Länge der Kohlenstoffkette wichtig für die Bin-

dung ist. Wie in Abbildung 4.1 (unten) gezeigt, kann die Kohlenstoffkette Wasser oder andere Solute aus dem Kanal verdrängen und die Bindung durch hydrophobe Wechselwirkungen verstärken. Die Kohlenstoffkette muss mindestens aus fünf Kohlenstoffatomen bestehen, denn der Vergleich zwischen den Analoga mit der Propoxy- und der Pentoxykette ergab, dass die Bindung des 4-Propoxybenzamidins (**28**) etwa $600\times$ schwächer war. Dies ist vermutlich darin begründet, dass die Propoxykette im Gegensatz zu der Pentoxykette den Kanal nicht komplett ausfüllt. Solutmoleküle können in den Kanal eindringen und diese entweder wieder aus der Tasche verdrängen oder die hydrophobe Bindung schwächen. Zwar bewegt sich der IC_{50} von 4-Pentoxybenzamidin (**29**) im mikromolaren Bereich, aber sie bindet dennoch $80\times$ schwächer als das Pentamidin. Die zweite Benzamidin-Gruppe könnte eine Art Stopfen darstellen, der die Solutmoleküle daran hindert in den Kanal zu gelangen. Zusammenfassend kann die gute Bindung des Pentamidins an drei Merkmalen festgemacht werden:

1. Aufgrund der positiven Ladung des Pentamidins kann es mit der negativen Ladung des Aspartats eine ionische Wechselwirkung eingehen.
2. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Kanal und der Fünferkohlenstoffkette wird durch die Verdrängung von Solutmolekülen in diesem Bereich erzeugt.
3. Die zweite Benzamidin-Gruppe hat die Funktion eines Stopfens und verhindert das Eindringen von Solutmolekülen.

Synthese der Pentamidin-Analoga

Die beiden Pentamidin-Analoga 4-Propoxybenzamidin (**28**) und 4-Pentoxybenzamidin (**29**) wurden eigens für die *Stopped-flow*-Messungen im Labor synthetisiert. Beide Analoga konnten erfolgreich jeweils in einer Zweistufensynthese hergestellt werden. Bei beiden Substanzen wurden die Amidinfunktionen über eine Aluminiumvermittelte Reaktion erzeugt. Die Substanzen konnten zwar synthetisiert werden, aber die Ausbeute war mit 13 - 30% eher gering. Die schlechte Ausbeute ist vermutlich darin begründet, dass nicht ausreichend Aluminiumreagenz **32** in der Lösung vorhanden war. Für die Aluminiumvermittelte Reaktion musste erstmal das Aluminium-Reagenz **32** aus Trimethylaluminium (**30**) und Ammoniumchlorid (**31**) hergestellt werden. Die Handhabung mit Trimethylaluminium (**30**) ist schwierig. Hierbei handelt es sich um eine pyrophore Flüssigkeit, explosionsartig mit Wasser zu Aluminiumhydroxid und Methan reagiert. Schon beim Öffnen des Gefäßes, in dem sich das Trimethylaluminium (**30**) befand, entstand weißer Rauch. Auch ent-

stand sofort ein weißer Niederschlag an den Glasutensilien, die mit dem Reagenz in Berührung kamen. Daher hat sich schon ein Großteil des Reagenzes während der Überführung zersetzt und sich folglich auf die Ausbeute an Aluminiumreagenz **32** ausgewirkt. Allerdings könnte dieses Problem durch einfache praktische Vorarbeiten verhindert bzw. minimiert werden. Indem die Glasgeräte ausgeheizt werden, entfernt sich die Feuchtigkeit an den Wänden. Dann sollte das Originalgebilde mit einem Septum versehen werden, damit diese nicht sofort mit der Luft in Berührung kommt. Eine weitere Möglichkeit ist die Überführung der Substanz mit Hilfe einer Kapillare direkt in ein Argon geflutetes Gefäß. Die Synthese der beiden Substanzen wurde nur einmal durchgeführt, da eine ausreichende Menge erhalten wurde, um diese in der *Stopped-flow*-Messung an Hefeprotoplasten mit *TbAQP2* zu testen.

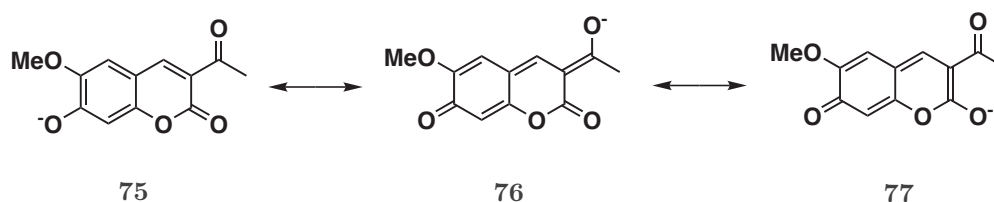
4.3.1 Mechanismus der Pentamidinaufnahme

Wenn das Pentamidin *TbAQP2* nicht passieren kann, wie gelangt es dann in die Trypanosomen? Die Arbeitsgruppe um D. Horn konnte durch Fluoreszenzaufnahmen feststellen, dass *TbAQP2* mit der Flagellumtasche des Trypanosoms in der Blutzellenform kolokalisiert ist [84]. Die Flagellumtasche ist eine Einstülpung in der Membran, der die Nährstoffaufnahme aus dem Blut erfolgt und Prozesse wie Exo- und Endocytose stattfinden [65]. Eine Möglichkeit, wie das Pentamidin in den Parasiten gelangen kann, ist folgende: Zunächst bindet das Pentamidin an das *TbAQP2*, welches sich in der Membran der Flagellumtasche befindet. Dann erfolgt der Prozess der Endocytose, bei dem das *TbAQP2* mitsamt dem Pentamidin in die Zelle aufgenommen wird. Dabei fungiert das *TbAQP2* als eine Art Rezeptor. Der Mechanismus der Pentamidinaufnahme könnte also als Rezeptor-vermittelte Endozytose betrachtet werden.

Um diese These zu stützen, sollten fluoreszierende Pentamidin-Analoga synthetisiert werden. Damit sollte die Pentamidinaufnahme zeitlich unter dem Mikroskop verfolgt werden. Als Fluorophore wurden zwei Substanzen gewählt, Fluorescein (**38**) und Cumarin (**39**). Beide sollten über eine Alkoxykette mit dem Benzamidin verknüpft werden (Abbildung 3.22).

Synthese der Cumarin-Pentamidin-Analoga

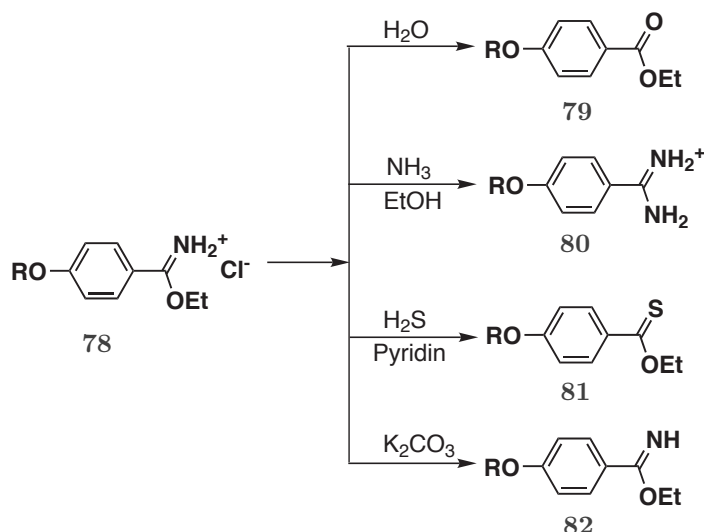
Zur Darstellung der Cumarin-Pentamidin-Analoga **40** und **41** wurden zwei Synthesewege durchgeführt (Schema 3.14). Die Synthesen der Grundbausteine, 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (**44**), 4-(1-Brompentoxy)-benzamidin (**45**) und der Cumarinderivate **42** und **43** konnten in guten Ausbeuten durchgeführt werden. Über den ersten Syntheseweg sollte zuerst die Vorstufe, ein Nitril, und daraus die Amidinfunktion generiert werden. Während die Williamson-Ethersynthese mit der Hydroxygruppe an der 6. Position des Cumarinderivates **42** eher geringe Ausbeuten ergab, verlief die Reaktion mit der Hydroxygruppe an der 7. Position sehr viel schneller und mit guten Ausbeuten. Die schnellere Reaktion mit dem 7-Hydroxycumarin **43** kann damit begründet werden, dass das Proton acider ist und leichter abgegeben wird. Die Acidität kann mit den mesomeren Grenzformeln erklärt werden, bei dem die negative Ladung durch die Acetylgruppe an der 3. Position stabilisiert wird (Schema 4.3). Weiterhin ist Cäsiumcarbonat eine stärkere Base als Kaliumcarbonat. Sie



Schema 4.3: Mesomere Grenzformeln des 7-Hydroxycumarins **43**.

bildet in aprotischen Lösungsmittel aufgrund der Größe des Kations leichter "nackte" Anionen. Mit der Nitrilverbindung **43** wurde die Pinner Reaktion durchgeführt (Schema 3.19). Anfängliche Löslichkeitsprobleme des Edukts **43** konnten durch den Zusatz von Chloroform gelöst werden und einen Umsatz zum Pinner Salz **56** konnte beobachtet werden. Der anschließende Schritt führte allerdings nicht zum Amidin, sondern zu einem anderen Produkt mit der Masse von 469. Bei dieser Reaktion ist anstelle des Amidins **47**, ein Ester entstanden. Vermutlich waren die Reaktionsbedingungen nicht wasserfrei und das Pinner Salz **56** hat mit Wasser als Nukleophil reagiert (Schema 4.4).

Im zweiten Syntheseweg wurde zuerst die Amidinfunktion erzeugt und das dabei entstehende Produkt **45** anschließend mit dem Cumarinderivat **42** umgesetzt (Schema 3.21). Allerdings hat sich bei dieser Reaktion das Cumarin zersetzt. Die Reaktion wurde wiederholt, aber diesmal mit der geschützten Amidinverbindung **45**, weil sich



Schema 4.4: Reaktion des Pinner Salzes **78**. Das Pinner Salz **78** kann mit unterschiedlichen Nucleophilen zum Ester **79**, Amidin **80**, Thioester **81** oder Amiden **82** reagieren.

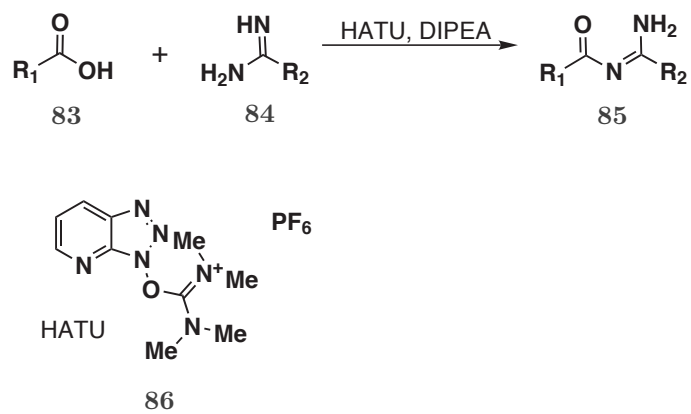
das Cumarinderivat vermutlich aufgrund der Basizität des Amidins zersetzt hatte. Für diese Synthese wäre vermutlich die Verbindung mit der 7-Hydroxygruppe besser geeignet, aber zu der Zeit befand sich diese Verbindung in der Nachsynthese und stand nicht zur Verfügung. Da aber eine Umsetzung mit dem Nitril **46** unter den Reaktionsbedingungen beobachtet wurde, sollte die Umsetzung mit dem geschützten Amidin **45** auch möglich sein. Eine Umsetzung wurde beobachtet und die anschließende Entschützung ergab auch die richtige Masse von 439 im Massenspektrum. Die Reaktion verlief zu langsam, als das genügend Produkt entstanden wäre, um dieses zu reinigen und mittels NMR zu analysieren. Die langsame Reaktion ist darin begründet, dass das geschützte Amidin **45** nicht so reaktiv war, wie die Nitrilverbindung **44**, die im ersten Syntheseweg eingesetzt wurde. Die Cyanogruppe übt einen -I-Effekt aus und wodurch die Verbindung **44** reaktiver ist.

Synthese der Fluorescein-Pentamidin-Analoga

Wie vermutet entstand das Fluorescein-Pentamidin-Analogon hauptsächlich als Ester **62**, sobald die Carboxylgruppe des Fluoresceins **38** ungeschützt mit dem Amidin **45** umgesetzt wurde (Schema 3.25). Dieses Analogon ist aufgrund der Estergruppe eher ungeeignet für die spätere Untersuchung in Trypanosomen, da es wahrscheinlich durch Esterasen in der Zelle abgebaut wird. Daher sollte die Etherverbindung

63 synthetisiert werden. Die Veretherung der Hydroxygruppe wurde schon vielfach beschrieben und Ausbeuten von 90 % häufig erreicht [111, 115]. Allerdings führte die direkte Synthese des 4-(1-Brompentoxy)-benzamidins (**45**) mit dem Methyl-Fluorescein **64** auch mit Veränderung der Reaktionsbedingungen nicht zum gewünschten Produkt. Dass keine schnelle Umsetzung beobachtet wurde, könnte an vielen Faktoren liegen. Sterische Effekte, z. B. bei großen Nukleophilen wie beim Fluorescein oder sperrige Gruppen am Alkylhalogenid könnten einen negativen Einfluss haben. Aber auch die Reaktivität des Alkylhalogenids kann durch Substituenteneffekte herabgesetzt werden. Vermutlich war bei dieser Reaktion eine Kombination aus beiden Faktoren der Grund für die langsame Umsetzung. Die Vermutung wurde bestätigt, nachdem die Reaktion mit dem Ethyl-Fluorescein **66** und 1,5-Dibrompentan (**52**) durchgeführt und eine Umsetzung zum gewünschten Produkt beobachtet wurde (Schema 3.27). Danach erfolgte die Williamson Ethersynthese mit 4-Hydroxybenzamidin (**74**). Eine komplette Umsetzung der Edukte wurde mittels DC nachgewiesen. Nach der Reinigung wurde ein Produkt mit der Masse von 519 gefunden, welches nicht dem Fluorescein-Pentamidin-Analogon **63** entsprach. Da diese Reaktion nicht zum gewünschten Produkt führte, wurde sie nicht weiter optimiert. Trotzdem wurden Überlegungen über mögliche Nebenprodukte getroffen. Entsprechen würde die Masse einer Verbindung, bei der die Amidinfunktion mit dem Ester oder der Säure zu einem Acylamidin reagiert hatte. Eine Reaktion zwischen einer Carboxyl- und einer Amidinfunktion wurde von Castanedo *et al.* berichtet [130]. Allerdings wurde für die Reaktion das Kupplungsreagenz (1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]pyridinium-3-oxidhexafluorophosphat (HATU, **86**) zur Aktivierung einer Carbonsäure verwendet, da diese sonst zu unreaktiv ist (Schema 4.5). Dass in dieser Synthese eine Reaktion zwischen der Säurefunktion am Fluorescein **38** und der Amidin-Gruppe stattfand, ist aus mehreren Gründen eher unwahrscheinlich. 1. Im Ansatz war kein Reagenz, um die Carboxylgruppe zu aktivieren. 2. Das Amidin würde aufgrund seiner basischen Eigenschaft die Carboxylgruppe deprotonieren und ein Salz bilden. 3. In der Reaktionslösung befand sich hauptsächlich noch der Ethylester und nur ein kleiner Teil wurde entschützt und lag als freie Carbonsäure vor. Eine weitere Möglichkeit, wie ein Acylamidin entstehen könnte, wäre die Reaktion des Ester mit dem Amidin unter Wasserabspaltung, ähnlich einer Aminolyse.

Zwar konnte auf diesem Wege kein Fluorescein-Pentamidin-Analogon mit einer Etherverknüpfung synthetisiert werden, aber die Reaktion einer Amidin- und einer Carboxylgruppe könnte bei der Synthese des Analogons helfen.



Schema 4.5: Reaktion zum Acylamidin **85**.

4.3.2 Ausblick

Mit der Synthese der Pentamidin-Analoga konnten wichtige Erkenntnisse, über die Stärke der Bindung zwischen dem Pentamidin und *TbAQP2*, gewonnen werden. Diese Erkenntnisse konnten auch verwendet werden, um geeignete fluoreszierende Pentamidin-Analoga zu entwerfen, um die Pentamidinaufnahme in das Trypanosom visuell verfolgen zu können.

Bei der Synthese der Cumarin-Pentamidin-Analoga über den Syntheseweg 1 ist es von Vorteil, die Pinner Reaktion zu wiederholen. Es bietet sich an, die Reaktion an einer Schlenk-Linie durchzuführen, um Feuchtigkeit aus der Luft auszuschließen. Für die Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogen sollte eine neue Synthese überlegt werden. Ein möglicher Weg wäre, die Reaktion zwischen der freien Carboxyl- und der Amidgruppe zu nutzen und diese analog einer Vorschrift aus Castaneda *et al.* durchzuführen [130]. Dabei kann das Pentamidin für die Synthese eingesetzt werden. Wichtig ist es darauf zu achten, dass ein Überschuss an Pentamidin vorhanden ist, damit nicht das symmetrische Produkt mit zwei Fluorescein-Molekülen entsteht. Anstatt einer Acylamidin- oder Etherverknüpfung ist eine Amidbindung auch denkbar. Dafür können *N*-Hydroxysuccinimid-Fluoresceine eingesetzt werden, die mit primären Aminen zum Amid reagieren. Freie Amidine können nicht eingesetzt werden, weil sie mit dem Amin um die Reaktion konkurrieren. Hier ist es sinnvoll, die Amidinfunktion im letzten Syntheseschritt zu erzeugen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit besteht aus drei Teilprojekten. Das erste Projekt umfasst die Etablierung der *nonsense*-Suppression Methode zum Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine. Dafür wurden die beiden Bausteine, das Dinukleotid pd-Cpa (5'-Phospho-2'-desoxycytidylyl(3'-5')adenosin) und die verkürzte tRNA(-CA) mit dem *amber* Anticodon, zur Herstellung der vollständigen, misacylierten tRNA CUA^{uaa} hergestellt. Das Dinukleotid konnte in sieben Stufen synthetisiert werden. Die verkürzte tRNA(-CA) wurde molekularbiologisch über eine *run off*-Transkription synthetisiert. Des Weiteren wurden die beiden unnatürlichen Aminosäuren 4-Iod-L-phenylalanin und 4-Methoxy-L-phenylalanin geschützt und aktiviert. Erste Versuche zur Veresterung des Dinukleotids mit der unnatürlichen Aminosäuren wurden gemacht. Für die Analyse des Reaktionsgemisches wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die Analyse ergab, dass neben dem einfach aminoacylierten, vermutlich auch das bisaminoacylierte Produkt entstanden war.

Das zweite Projekt bestand in der Untersuchung von Amphipolen in der zellfreien Proteinsynthese, welche bereits im Arbeitskreis etabliert ist. Die Amphipole sollen als Alternative zu Detergenzien getestet werden, da sie eine proteinstabilisierende Wirkung haben und eventuell Proteine besser in der nativen Faltung fördern. Daher wurden die kommerziell erhältlichen Amphipole A8-35, PMAL-C8, PMAL-C12 und C16 im zellfreien System getestet. Die Testung ergab, dass von den vier getesteten Amphipole, nur in PMAL-C8 sowohl GFP als auch das Membranprotein *PfAQP*-GFP zellfrei hergestellt werden konnte. Es zeigte sich auch, dass eine höhere Konzentration an PMAL-C8 im Ansatz die zellfreie Proteinsynthese nicht stört, wie es bei den anderen drei Amphipolen der Fall war. PMAL-C8 wurde mit Detergenzien aus der Brij-Familie in der zellfreien Synthese verglichen. Dazu wurden unterschiedliche GFP-Fusionsproteine in Brij-Detergenzien und in PMAL-C8 zellfrei hergestellt: Der Formiat-Transporter aus *Escherichia coli* *ecFokA*-GFP, der

Harnstoff-Transporter B aus der Ratte *rUT-B-GFP* und der M2-Kanal aus Influenza Virus A M2-GFP. Die Ergebnisse zeigten, dass in PMAL-C8 alle Proteine hergestellt werden konnten und dass die Ausbeute an richtig gefaltetem Protein mit den Brij-Detergenzien vergleichbar war. Eine Verschiebung zu richtig gefaltetem Protein in seiner nativen Form konnte nicht beobachtet werden. PMAL-C8 wurde auch zur präparativen zellfreien Synthese von M2-GFP eingesetzt. Mit Hilfe der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation konnte nachgewiesen werden, dass sie auch in Gegenwart von PMAL-C8 eingebaut werden können. Allerdings stört eine erhöhte Konzentration an PMAL-C8 die Bildung von Proteoliposomen. Die Protonenleitfähigkeit des M2-Kanals konnte am SURFE²R nachgewiesen, aber nicht durch Amantadin inhibiert werden, wie es beim M2-Kanal der Fall war, der in einem Brij-Detergenz hergestellt wurde.

Das dritte Projekt umfasst die Untersuchung der Pentamidinaufnahme in *Trypanosoma brucei*. Die Untersuchung wurde am Aquaglyceroporin aus Trypanosomen (*TbAQP2*) durchgeführt, da postuliert wurde, dass aufgrund des speziellen Selektivitätsfilters von *TbAQP2*, das Pentamidin den Kanal direkt passieren kann. In einer Voruntersuchung konnte festgestellt werden, dass Pentamidin den Kanal nicht passiert, sondern inhibiert. Die Pentamidin-Analoga 4-*n*-Propoxybenzamidin und 4-*n*-Pentoxybenzamidin wurden eigens für die Untersuchung synthetisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass ionische und hydrophobe Wechselwirkungen des Pentamidins mit *TbAQP2* für die starke Bindung verantwortlich sind. Um die Pentamidinaufnahme visuell in Zellen verfolgen zu können, wurden basierend auf den Ergebnissen fluoreszierende Pentamidin-Analoga mit Fluorescein und Cumarin als Fluorophore entworfen. Die Vorstufen zur Synthese der Cumarin- und Fluorescein-Pentamidin-Analoga konnten erfolgreich synthetisiert werden. Massenspektrometrische Analysen der Reaktionsgemische zur Synthese der Cumarin-Pentamidin-Analoga zeigten einen Umsatz zum Produkt, wobei die Synthesen noch weiter optimiert werden müssen. In der Synthese des Fluorescein-Pentamidin-Analogen mit einer Etherverknüpfung zeigte sich, dass die Amidinfunktion mit der Carboxylgruppe zum Acylamidin reagierte. Das Fluorescein-Pentamidin-Analogen mit einer Esterverknüpfung konnte erfolgreich synthetisiert werden.

6 Summary

This work consists of three projects.

The first project was to establish the nonsense suppression method for the incorporation of unnatural amino acids into proteins. Therefore, the two components pdCpA (5'-phospho-2'-deoxycytidylyl(3'-5')adenosine) and the truncated tRNA(-CA) with the *amber* anticodon were synthesized. The dinucleotide pdCpA was synthesized in seven steps. The truncated tRNA(-CA) was prepared by *run off* transcription. For the esterification with pdCpA, the unnatural amino acids 4-iodo-L-phenylalanine and 4-methoxy-L-phenylalanine were activated and protected. The progress of the esterification can be monitored by reverse phase HPLC. For this purpose a HPLC method were developed.

The second project was to test commercially available amphipols in the cell-free expression system, which is already established in this work group. A8-35, PMAL-C8, PMAL-C12 and PMAL-C16 were tested as alternatives to detergents, because of their protein stabilizing properties. Cell-free expression of GFP and *Pf*AQP was only possible in PMAL-C8, even at higher concentrations there was no sign of inhibition. PMAL-C8 and detergents of the Brij family were compared in the cell-free synthesis of different membrane proteins: the formate-transporter of *Escherichia coli* *ecFokA*, the urea-transporter B from rat *rUT-B* and the M2 proton channel of the influenza A virus. All membrane proteins were C-terminal GFP-fusion proteins, where GFP can indicate the folding state. As a result, all membrane proteins were synthesized in the presence of PMAL-C8. There was no difference in the protein yield, whether the membrane proteins were synthesized in PMAL-C8 or in Brij detergents. M2-GFP was also produced at preparative scale in the presence of PMAL-C8. The formation of proteoliposomes were determined by sucrose gradient centrifugation, however, higher concentrations of PMAL-C8 seem to inhibit the formation of proteoliposomes. Proton conductance of M2-GFP was measured, but compared to M2-GFP expressed

in the presence of Brij78, it could not be inhibited with amantadine.

The third project was to provide tools for studying the mechanism of pentamidine uptake in *Trypanosoma brucei*. AQP2-specific gene knockout generated pentamidine resistance. Therefore the group of D. Horn proposed the direct passage of pentamidine via *TbAQP2*, because of their unusual selectivity filter. However our preliminary investigation showed full inhibition of *TbAQP2* by pentamidine. To investigate which structure properties were important for the inhibition of *TbAQP2*, the pentamidine analogues 4-*n*-propoxybenzamidinium and 4-*n*-pentoxybenzamidinium were synthesized. According to the results ionic and hydrophobic interactions were responsible for the binding. In order to visualize the uptake of pentamidine in trypanosomes, fluorescent pentamidine analogues with fluorescein and coumarin as fluorophores were designed. Synthesis of the precursors of the fluorescein- and coumarin-pentamidine-analogues were successful with appropriate yields. Mass spectra analysis provided evidence for the chemical reaction to have yielded the coumarin-pentamidine-analogues, but the reactions need further optimization. There was a side reaction to an acylamidinium during the synthesis of the fluorescein-pentamidine-analogue with the ether bond. However, the fluorescein-pentamidine-analogue with an ester bond was successfully synthesized.

7 Material und Methoden

7.1 Molekularbiologische und proteinchemische Arbeiten

7.1.1 Material und Enzyme

ABCR, Karlsruhe

Calciumfolinat

Affymetrix, High Wycombe, UK

Amphipol A8-35, PMAL-C8, PMAL-C12, PMAL-C16

Amersham Biosciences, GE Healthcare, München

ECL plus Western Blotting Detection System, HYBOND™-P Western Blot Membranen, WHATMAN NUCLEOPORE TRACKETCH MEMBRANES

AppliChem, Darmstadt

LB-Agar-Pulver, LB-Medium-Pulver, SDS, MES, n-Octyl- β -D-glucopyranosid, BRIJ®35, BRIJ®58, Phosphoenolpyruvat, Magnesiumacetat

Avanti Polar lipids, Alabaster, USA

E. coli Polar Lipid Extract

Bio-Rad, München

POLYPREP® CHROMATOGRAPHY COLUMNS, BIO-BEADS®SM-2, Bio Rad Protein *Assay*-Reagenz

Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme, dNTPs, λ -DNA, Inorganic Pyrophosphatase, RIBOLock™ RNASE INHIBITOR, *RiboRuler™ Low Range RNA Ladder*, *RNA Loading Dye Solution (2×)*, T4-DNA-Ligase, T7-RNA-Polymerase, pBlueskript II SK (-)

Genaxxon BioScience, Ulm

GENAGAROSE, Ampicillin, TEMED

Glycon, Luckenwalde

n-Dodecyl- β -maltosid

J. T. Baker, München

Essigsäure, Ethanol, Isopropanol, Methanol

Macherey-Nagel, Düren

NUCLEOBOND® PC500

Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid, AMICON® ULTRA-4 Zentrifugenfilter

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

New England Biolabs, Frankfurt am Main

Low Range ssRNA Ladder

Peqlab, Erlangen

PEQGOLD PRESTAINED PROTEIN MARKER III

Promega, Mannheim

WIZARD® PLUS SV MINIPREPS DNA PURIFICATION SYSTEM

Roche Diagnostics, Mannheim

Pyruvat-Kinase, *E. coli*-tRNA, COMPLETE EDTA-FREE PROTEASE INHIBITOR COCKTAIL TABLETS, pIVEX2.3

Roth, Karlsruhe

APS (Ammoniumperoxidisulfat), Agar Agar, Ammoniak, L-Arginin, BSA (Albumin Fraktion V), Calciumchlorid, Chloroform, DEPC (Diethylcarbonat), Dialysierschlauch Visking Cellulose, Dikaliumhydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, DTT (Dithiothreitol), EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Formaldehyd (37 %), Glucose, Glycerol, HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, L-Leucin, Magnesiumchlorid Hexahydrat, 2-Mercaptoethanol, Milchpulver, MOPS (3-(*N*-Morpholino)-Propansulfonsäure), Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, L-Prolin, Roti[®] Aqua P/C/I, Rotiphorese[®]-Gel 40 Rotiphorese[®] Blau R, Saccharose, Trichloressigsäure, TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), TRITON[™]X-100, TWEEN[®]20

Sigma-Aldrich, München

Acetylphosphat, ATP (Adenosintriphosphat), L-Alanin, L-Asparagin Monohydrat, L-Asparaginsäure (Natriumsalz), Borsäure, BRIJ[®]98, L-Cystein, CTP (Cytidintriphosphat), Digitonin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure (Natriumsalz), GTP (Guanosintriphosphat), Glycin, Harnstoff, L-Histidin Monohydrochlorid Monohydrat, Imidazol, L-Isoleucin, L-Lysin Monohydrochlorid, L-Methionin, PEG 8000, L-Phenylalanin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, UTP (Uridintriphosphat), L-Valin

Südlaborbedarf, Gauting

HIGH YIELD[®]PCR CLEAN-UP & GEL-EXTRACTION KIT

Thermo Scientific, Schwerte

BRIJ[®]78, SLIDE-A-LAYZER[®]DIALYSIS CASSETTES

Qiagen, Hilden

Ni-NTA Agarose

7.1.2 Geräte

Beckman Coulter, Krefeld

CEQ™8000 Genetic Analysis System

Beckman Coulter, Krefeld

OPTIMA™XL-80K ULTRAZENTRIFUGE

Bio-Rad, München

POWER PAC 2000, TRANSBLOT® SD SEMIDRY TRANSFER CELL

Clemens, Osterode

PCR-Gerät PRIMUS ADVANCED HT2X und HT MANAGER SOFTWARE

Eppendorf, Hamburg

Photometer BIOPHOTOMETER

PerkinElmer, Waltham, USA

Fluorimeter LS 55

Peqlab, Erlangen

SDS-PAGE-Kammer PERFECTBLUE® vertikales Doppelsystem Twin S

Roche Diagnostics, Mannheim

LUMI IMAGER™F1

Sartorius, Göttingen

Fermenter BIOSTAT® APLUS

Schott Instruments, Mainz

pH-Meter Lab 850

7.1.3 Plasmide

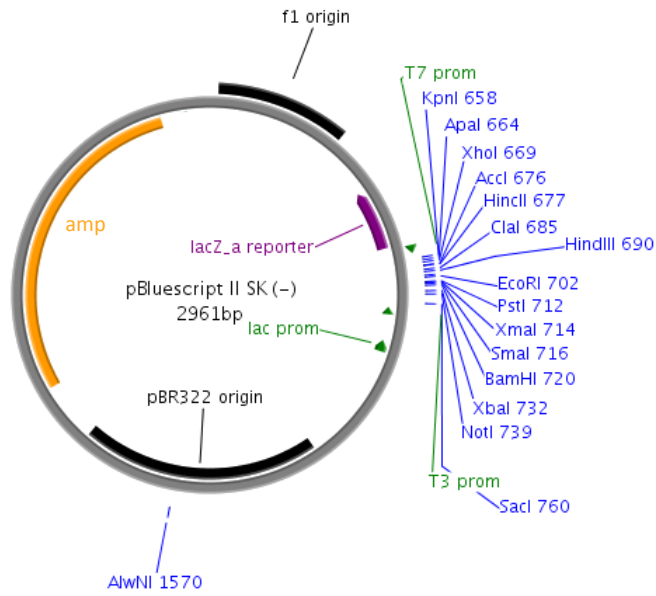


Abbildung 7.1: pBluescript II SK (-).

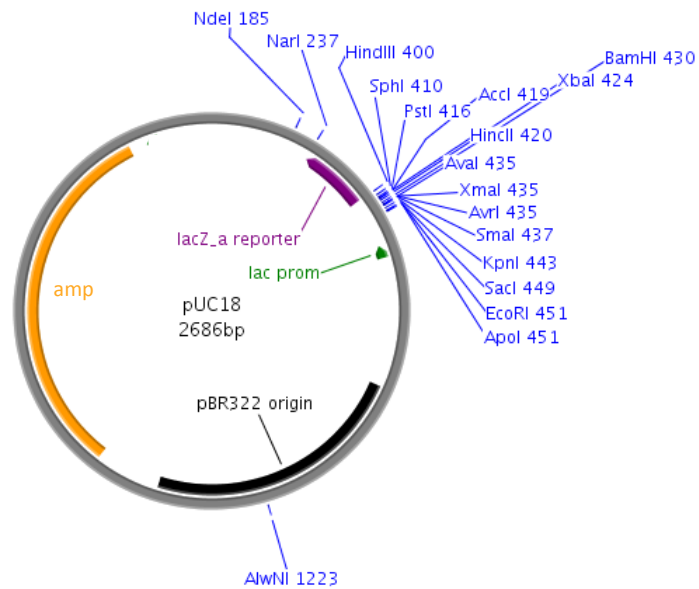


Abbildung 7.2: pUC18.

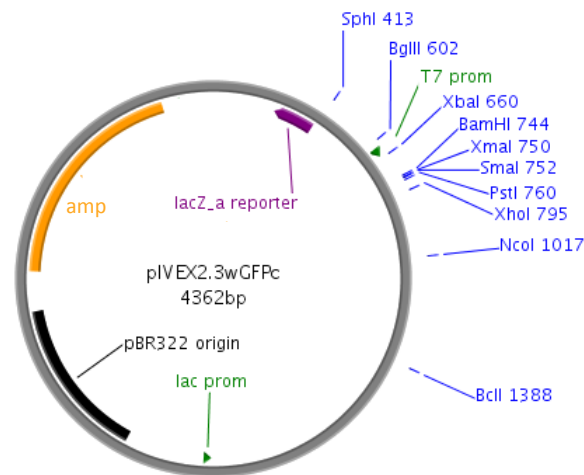


Abbildung 7.3: pIVEX2.3wGFPc.

7.1.4 DNA-Sequenzen

Name	Beschreibung	Gene ID	Quelle
<i>Pf</i> AQP	Aquaporin aus <i>Plasmodium falciparum</i>	810885	NCBI
M2	Protonenkanal aus <i>Influenza Virus A</i>	3655107	NCBI
<i>ec</i> FokA	Formiat-Transporter aus <i>Escherichia coli</i>	945513	NCBI
<i>r</i> UT-B	Harnstoff-Transporter aus Ratte	54301	NCBI

7.1.5 Oligonukleotide (*Primer*)

Sequenzierprimer

Name	Sinn	Sequenz	Vektor
T3	<i>as</i>	GTG TAA GTT GGT ATT ATG TAG	pBluescript
T7	<i>s</i>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pBluescript
- 47	<i>s</i>	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	pUC18

7.1.6 *E. coli* Stämme

Name	Genotyp	Quelle
DH5 α	F_ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_f</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> λ ⁻	Hanahan, 1983

7.1.7 Antikörper

Primär-Antikörper

Name	Beschreibung	Verdünnung
GFP (FL)	Polyklonaler Antikörper gegen <i>GFP</i> -Sequenz, 0,2 mg/mL, Kaninchen, Santa Cruz	1:10000

Sekundär-Antikörper

Name	Beschreibung	Verdünnung
anti Kaninchen	Polyklonaler Antikörper gegen die leichte und die schwere Kette des Kaninchen IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, 0,4 mg/mL, Ziege, Jackson Immuno Research	1:10000

7.1.8 Puffer, Medien und Lösungen

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat, pH 8,0
1 mM EDTA

Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL)

1 Tablette Ethidiumbromid
10 mL *Aqua bidest.*
lichtgeschützt bei 4 °C lagern

Probenpuffer orange (10×)

0,4 % Orange G
30 % Glycerol
100 mM EDTA

Agarose-Gelelektrophorese von RNA

MOPS-Puffer (10×)

10 mL 1 M MOPS, pH 7,0
0,83 mL 3 M Natriumacetat, pH 5
1,0 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0
38 mL DEPC behandeltes Wasser

***E. coli* Nährmedien**

LB-Agarplatten (Lennox)

35 g/L LB-Agar

LB-Amp-Platten

100 µg Ampicillin/mL Plattenagar

LB-Medium

10 g/L Trypton
10 g/L Natriumchlorid
5 g/L Hefeextrakt

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Sammelpuffer (4×)

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,4 % SDS

Trennpuffer (4×)

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,4 % SDS

SDS-Probenpuffer (4×)

250 mM Tris-HCl, pH 6,8
 400 mM DTT
 0,02 % Bromphenolblau
 8 % SDS
 40 % Glycerol

Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8,3
 192 mM Glycin
 0,1 % SDS

Entfärbelösung

10 % Essigsäure
 30 % Ethanol

Rotiphorese[®]-Blau-R-Färbelösung

50 % Rotiphorese[®] Blau R

Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

TBE-Puffer (10×)

108 g Tris
 55 g Borsäure
 40 mL 0,5 M EDTA, pH 8
 mit *Aqua bidest.* auf 1000 mL auffüllen,
 sterilfiltrieren

Western Blot

Transferpuffer (5×)

25 mM Tris-HCl, pH 8,3
 192 mM Glycin
 0,0375 % SDS

Transferpuffer (1×)

10 mL 5× Transferpuffer
 10 mL Methanol
 30 mL *Aqua bidest.*

TBS-Puffer (10×)

1,35 M NaCl
 0,2 M Tris-HCl

TBS-T-Puffer

100 mL 10× TBS-Puffer
 900 mL *Aqua bidest.*
 1 mL Tween 20

M-TBS-T-Puffer

3 % Milchpulver in TBS-T-Puffer

S30-Extrakt

*YPTG-Medium (2×)**

14,95 g	KH ₂ PO ₄
45,65 g	K ₂ HPO ₄
50 g	Hefe-Extrakt
80 g	Bacto Tryptone
25 g	NaCl
99 g	Glucose
	auf 5 L auffüllen

S30-Puffer B

10 mM	Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM	Magnesiumacetat
0,6 mM	KCl
1 mM	DTT
1 Tablette	COMPLETE

*Der Phosphat-Puffer wurde separat hergestellt und autoklaviert. Glucose wurde in 190 - 200 mL *Aqua bidest.* gelöst und anschließend sterilfiltriert.

S30-Puffer A

10 mM	Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM	Magnesiumacetat
0,6 mM	Kaliumacetat

S30-Puffer C

10 mM	Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM	Magnesiumacetat
0,6 mM	KCl
0,5 mM	DTT

Protein Reinigung mit DDM

Reinigungspuffer I (10×)

3 M	NaCl
200 mM	Tris HCl, pH 8

Reinigungspuffer I (1×)

300 mM	NaCl
20 mM	Tris HCl, pH 8

Reinigungspuffer II (10×)

3 M	NaCl
200 mM	Tris HCl, pH 8
0,5 %	DDM

Reinigungspuffer II (1×)

300 mM	NaCl
20 mM	Tris HCl, pH 8
0,05 %	DDM

Waschpuffer

300 mM	NaCl
20 mM	Tris HCl, pH 8
20 mM	Imidazol
0,05 %	DDM

Elutionspuffer

300 mM	NaCl
20 mM	Tris HCl, pH 8
100 - 500 mM	Imidazol
0,05 %	DDM

Protein Reinigung mit PMAL-C8*Reinigungspuffer I (10×)*

3 M NaCl
200 mM Tris HCl, pH 8

Reinigungspuffer I (1×)

300 mM NaCl
20 mM Tris HCl, pH 8

Reinigungspuffer II (10×)

3 M NaCl
200 mM Tris HCl, pH 8
10 mg/mL PMAL-C8

Reinigungspuffer II (1×)

300 mM NaCl
20 mM Tris HCl, pH 8
1 mg/mL PMAL-C8

Waschpuffer

300 mM NaCl
20 mM Tris HCl, pH 8
20 mM Imidazol
1 mg/mL PMAL-C8

Elutionspuffer

300 mM NaCl
20 mM Tris HCl, pH 8
100 - 500 mM Imidazol
1 mg/mL PMAL-C8

Protein-Rekonstitution*Rekonstitutionspuffer (Messpuffer)*

30 mM MES KOH, pH 5,8
140 mM KCl
4 mM MgCl₂

Gradientenpuffer

100 mM NaCl
20 mM Tris HCl, pH 7,5

7.1.9 Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren**Isolierung, Reinigung und Lagerung**

Für die Gewinnung von kleineren Mengen Plasmid-DNA wurden entsprechende Klone von der Platte isoliert und in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum gegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des WIZARD[®] PLUS SV MINIPREPS DNA PURIFICATION SYSTEM isoliert und gereinigt. Abweichend von dem vorgegebenen Protokoll wurde auf die alkalische Protease verzichtet und die DNA mit 50 µL autoklaviertem Wasser eluiert.

Für die zellfreie Synthese wurde eine größere Menge an DNA benötigt. Diese konnte mit Hilfe des NUCLEOBOND[®] PC500 Kit gewonnen werden. Für die Maxipräpara-

tionen wurden 500 mL LB-Medium mit 5 mL Vorkultur angeimpft.

Zum Anlegen der entsprechenden *E. coli* Dauerkultur wurde 80 % Glycerol mit der Zellsuspension 1:1 gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und die Reinheit der gewonnenen DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Nach folgender Formel wurde die Konzentration berechnet:

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{L}] = A_{260} \cdot f \quad (7.1)$$

$f = 40$ bei RNA, Einzelstrang-DNA, Oligonukleotiden

$f = 50$ bei Doppelstrang-DNA, Plasmiden

Anhand des Verhältnisses A_{260}/A_{280} kann eine Aussage über die Proteinkontamination der Präparationen getroffen werden. Eine ausreichend saubere DNA Lösung für molekularbiologische Arbeiten sollte ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,8 - 2,0 haben. Bei RNA sollte sie zwischen 2,0 - 2,2 liegen.

Restriktionsverdau

Generell wurde für den Verdau mindestens 200 ng DNA eingesetzt. Der Verdau erfolgte mit 1 U Enzym/ μg DNA in dem vom Hersteller angegebenen Puffer und bei entsprechender Temperatur und empfohlener Zeitangabe.

Agarose Gelelektrophorese

Für die Größenauftrennung von DNA-Fragmenten sowie ihrer Konzentrationsbestimmung wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Je nachdem in welchen Bereich die Größenauftrennung lag, wurden die Agarosekonzentrationen angepasst sowie unterschiedliche Marker und Agarose verwendet (Tabelle 7.1).

Tabelle 7.1: Agarosekonzentrationen.

Größenbereich	Konz. [%]	Laufzeit [min]	Marker
> 800	1	20	λ -DNA/ <i>Pst I</i>
500 - 1000	2	35	λ -DNA/ <i>Pst I</i>
< 500	3 (LowMelt)	60	pBluescript/ <i>Ssp I</i> , <i>Msp I</i>

Zunächst wurde Agarose in 50 mL TAE-Puffer suspendiert. Um die Agarose zu lösen, wurde die Suspension in der Mikrowelle erwärmt. Nach kurzem Abkühlen wurde 1 μL

Ethidiumbromidlösung (10 mg/L) zugegeben. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 20 - 60 min bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Klonierung

Der benötigte Vektor und das *insert* wurden jeweils in einem Restriktionsverdau mit den passenden Enzymen geschnitten. Die DNA Fragmente wurden mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Banden mit Hilfe des HIGH YIELD[®] PCR CLEAN-UP & GEL-EXTRACTION KIT aus dem Gel extrahiert und gereinigt. Die Elution erfolgte mit 50 μ L gereinigtem Wasser. Die Konzentration der extrahierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese durch Vergleich der Bandenintensitäten bestimmt. Die anschließende Ligation erfolgte mit der T4-DNA-Ligase 10 min bei Raumtemperatur. Es wurde 30 ng Vektor-DNA eingesetzt und das Verhältnis von *insert* zu Vektor betrug 3:1.

Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

100 μ L kompetente Zellen wurden 5 min auf Eis aufgetaut. Zu den kompetenten Zellen wurden 1 pg - 100 ng Plasmid-DNA oder 5 μ L Ligationsansatz gegeben. Der Ansatz wurde zunächst 30 min auf Eis, dann 1 min bei 42 °C und zuletzt weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 900 μ L LB-Medium zugegeben und bei 37 °C 45 - 60 min geschüttelt. 100 μ L wurden entnommen und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger. Für die PCR wurden vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in dNTPs eingesetzt. Für den PCR-Ansatz wurde 0,5 - 6,5 μ L (50 - 100 fmol) DNA mit *Aqua bidest.* 6,5 μ L aufgefüllt. Zum Ansatz wurden zusätzlich 3 μ L *Aqua bidest.* gegeben, um den Wasserverlust beim darauffolgenden *Preheat* (5 min, 86 °C) auszugleichen. Der Ansatz wurde nach dem *Preheat*, sofort auf Eis gestellt und es wurden 1,5 μ L (5 μ M) Primer sowie 2 μ L DTCS-*Quick Start Mix* dazupipettiert. Das PCR-Programm ist in Tabelle 7.2 angegeben.

Anschließend wurde zu jeder Probe 5 μ L frisch hergestellte *Stop Solution*, bestehend aus 2 μ L Natriumacetat (3 M, pH 5,2), 2 μ L Natrium-EDTA (100 mM, pH 8,0) und 1 μ L Glycogen (20 mg/mL) zugegeben. Zur Präzipitation der DNA wurde 60 μ L kaltes Ethanol (95 %) zugegeben und 15 min bei 4 °C und 16400 \times g zentrifugiert. Das

Tabelle 7.2: PCR-Programm für die DNA Sequenzierung.

Denaturierung	96 °C	2 min
30 Zyklen		
Denaturierung	96 °C	20 s
<i>Annealing</i>	50 °C	20 s
Elongation	60 °C	4 min
Lagerung	8 °C	∞

erhaltene Pellet wurde zweimal gewaschen (200 μ L kalter Ethanol (70 %)) und 5 min bei 4 °C und 16400 \times g zentrifugiert. Nach 10 min Trocknen im Vakuum wurde das Pellet in 20 μ L SLS (*Sample Loading Solution*) resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

7.1.10 Arbeiten mit RNA - tRNA Synthese

Alle Laborutensilien zur Bearbeitung von RNA wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt. Dazu wurden alle Utensilien über Nacht in 0,1 % DEPC Wasser eingelegt und am nächsten Tag autoklaviert. Alle benötigten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser (DEPC-H₂O) hergestellt. Gefäße, die nicht mit DEPC behandelt und autoklaviert wurden, wurden einmal mit 1 % Wasserstoffperoxid-Lösung, danach mit DEPC-behandeltem Wasser gespült.

Linearisierung der Plasmid-DNA

15 μ g Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *Fast Digest FokI* linearisiert. Ein 50 μ L Ansatz, wie sie in Tabelle 7.3 dargestellt ist, wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 7.3: Pipettierschema zur Linearisierung.

15 μ g	DNA
5 μ L	<i>Fast Digest FokI</i>
5 μ L	<i>Fast Digest Buffer (10\times)</i>
auf 50 μ L auffüllen mit ddH ₂ O	

Um zu überprüfen, ob die Linearisierung vollständig abgelaufen war, wurde eine Gelelektrophorese mit einem 3% *Low Melt* Agarosegel oder 2% Agarosegel durch-

geführt (Kapitel 7.1.9). Vom Verdau wurde $2\ \mu\text{L}$ entnommen und mit $8\ \mu\text{L}$ ddH₂O, $1\ \mu\text{L}$ SDS (0,17%) und $1\ \mu\text{L}$ *Loading Buffer* versetzt. Die Probe wurde 5 min bei $65\ ^\circ\text{C}$ inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurde. Dies führte zur Inaktivierung des Enzyms und zur Freigabe der DNA.

Isolierung und Präzipitation der linearisierten DNA

Die DNA wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert und gereinigt. Der Verdau wurde mit DEPC-H₂O auf $500\ \mu\text{L}$ aufgefüllt und es wurde $500\ \mu\text{L}$ Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei $4\ ^\circ\text{C}$ und $15900 \times g$ zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, erneut mit $500\ \mu\text{L}$ Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung versetzt und zentrifugiert. Die Schritte wurden mit Chloroform wiederholt. Anschließend wurde zu der wässrigen Phase $1/10 \times$ Volumen $3\ \text{M}$ Natriumacetat-Lösung und $2,5 \times$ Volumen kaltem 100% Ethanol gegeben. Die DNA wurde entweder über Nacht bei $-20\ ^\circ\text{C}$ oder 1 h bei $-80\ ^\circ\text{C}$ gefällt und darauffolgend 15 min bei $4\ ^\circ\text{C}$ und $15900 \times g$ zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde zweimal mit je $100\ \mu\text{L}$ kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach 3 min trocknen der DNA bei Raumtemperatur wurde sie in $10\ \mu\text{L}$ DEPC-H₂O aufgenommen.

Transkription

In einem $100\ \mu\text{L}$ -Transkriptions-Ansatz wurde mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase die verkürzte tRNA synthetisiert. Das Pipettierschema ist in Tabelle 7.4 gezeigt. Der Transkriptionsansatz wurde über Nacht bei $37\ ^\circ\text{C}$ inkubiert.

Tabelle 7.4: Pipettierschema zur Transkription.

$40\ \mu\text{L}$	DEPC-H ₂ O
$10\ \mu\text{L}$	linearisierte DNA
$20\ \mu\text{L}$ ($1 \times$)	Transkriptionspuffer ($5 \times$)
$20\ \mu\text{L}$ ($2\ \text{mM}$)	NTP-Mix (je $10\ \text{mM}$)
$2,5\ \mu\text{L}$ ($100\ \text{U}$)	<i>Ribo Lock RNase Inhibitor</i> ($40\ \text{U}/\mu\text{L}$)
$0,5\ \mu\text{L}$ ($0,25\ \text{U}$)	<i>Inorganic Phosphatase</i> ($0,5\ \text{U}/\mu\text{L}$)
$7,5\ \mu\text{L}$ ($150\ \text{U}$)	T7-RNA-Polymerase ($20\ \text{U}/\mu\text{L}$)

Die RNA wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Der Transkriptionsansatz wurde mit DEPC-H₂O auf $500\ \mu\text{L}$ aufgefüllt und es wurde $1 \times$ Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung hinzugefügt. Es wurde 5 min bei $4\ ^\circ\text{C}$ und $16400 \times g$ zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, erneut mit $1 \times$

Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung versetzt und zentrifugiert. Die Schritte wurden mit Chloroform wiederholt. Anschließend wurde zu der wässrigen Phase 1/10× Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5× Volumen kaltem 100 % Ethanol gegeben. Die DNA wurde entweder über Nacht bei -20 °C oder 1 h bei -80 °C gefällt.

Der Ansatz wurde 30 min bei 4 °C und 16400 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µL kaltem 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 4 °C und 15900 × g zentrifugiert. Nach 3 min trocknen bei Raumtemperatur wurde die tRNA in 10 µL DEPC-H₂O aufgenommen.

Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Isolierung und Reinigung der tRNA wurde ein 6 % Harnstoff-Polyacrylamidgel angefertigt (Tabelle 7.5).

Tabelle 7.5: Zusammensetzung vom 6 % Harnstoff-Polyacrylamidgel

750 µL	TBE (10×)
5,25 mL	Harnstoff (10 M)
300 µL	DEPC-H ₂ O
1,12 mL	Acrylamid-Lösung (40 %)
3,25 µL	TEMED
50 µL	APS (10 %)

Als Marker wurde der *Low Range ssRNA Ladder* verwendet. 4 µL Marker wurde mit 4 µL DEPC-H₂O und 8 µL *ssRNA Ladder Loading Buffer* (2×) versetzt. Die Proben wurden 1:1 mit dem *RNA Loading Dye* (2×) gemischt. Der Marker und die Proben wurden anschließend 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurden die RNA-Fragmente 90 min bei 80 V elektrophoretisch getrennt. Die entsprechende Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und zerkleinert. Zu den Gelstücken wurden 40 µL 3 M Natriumacetat und 360 µL DEPC-H₂O gegeben und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die Gelstücke wurden 5 min bei 4 °C und 600 × g zentrifugiert. Zu der wässrigen Phase wurde 400 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung gegeben und 10 min bei 4 °C bei 15900 × g zentrifugiert. Nach Zugabe von 2,5× Volumen kaltem 100 % Ethanol wurden die RNA bei -20 °C über Nacht gefällt. Die Proben wurden 30 min bei 4 °C und 16400 × g zentrifugiert. Die RNA wurde mit 200 µL kaltem 70 % Ethanol gewaschen und anschließend 5 min bei 4 °C, 16400 × g zentrifugiert. Nach 3 min trocknen bei Raumtemperatur wurde die RNA in 30 µL DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentration wurde, wie in Abschnitt 7.1.9 beschrieben,

photometrisch bestimmt. Die tRNA-Proben wurden anschließend bei -80°C eingefroren.

MOPS-Formaldehyd-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Größe sowie der Qualität der tRNA wurde ein 2% MOPS-Formaldehyd-Gel angefertigt. Dazu wurde 1 g Agarose in 50 mL DEPC- H_2O suspendiert. Um die Agarose zu lösen, wurde die Suspension in der Mikrowelle erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurde 5 mL $10\times$ MOPS-Puffer und 1,5 mL 37% Formaldehyd zugegeben. Als Marker wurde ebenfalls der *Low Range ssRNA Ladder* verwendet. Die Proben wurden wie oben beschrieben behandelt und anschließend 90 min bei 80 V elektrophoretisch getrennt.

7.1.11 Zellfreie Proteinsynthese

Die Durchführung der zellfreien Proteinsynthese sowie die Herstellung der Komponenten erfolgte nach Schwarz *et al.* [43] Alle Komponenten wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Herstellung des S30-Extraktes

Für die Herstellung des S30-Extraktes wurde eine Dauerkultur mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pRep4 eingesetzt. Die Herstellung wurde in einem 5 L Fermenter mit $2\times$ YPTG-Medium durchgeführt. Zunächst wurde 5 mL LB-Medium mit von einer frisch hergestellten Platte gepickten *E. coli*-Klon angeimpft. Diese Vorkultur wurde 8 h bei 37°C inkubiert. 0,5 mL Vorkultur wurden zu 50 mL LB-Medium gegeben und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Fermenter wurde mit 5 L YPTG-Medium ($2\times$) und allen autoklavierbaren Komponenten autoklaviert. Die Fermentation wurde bei 500 - 700 rpm durchgeführt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Sauerstoffsättigung stets über 80% lag. Die Kalibrierung der Sauerstoffelektrode wurde mit dem Medium ohne Rühren (0%) und mit Luftestrom bei maximaler Rührerdrehzahl (100%) durchgeführt. Anschließend wurde der Phosphatpuffer, die Glucoselösung sowie 0,5 mL Antifoam Y30 zur Verminderung der Schaumbildung hinzugegeben. Das Medium wurde auf 37°C gebracht und die vorbereitete 50 mL *E. coli*-Kultur wurde zugegeben. Alle 20 min wurden Proben entnommen und die OD_{600} vermessen. Nach Erreichen einer OD_{600} von 2,5 - 3 wurde der Ansatz innerhalb von 45 min auf 12°C runtergekühlt. Die Zellen wurden 15 min

bei 4 °C und 4500 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit je 150 mL gekühltem S30-Puffer A gewaschen (10 min, 4 °C und bei 8000 × g). In 110 % (vol/wt) kaltem S30-Puffer B wurden die Zellen resuspendiert und mittels *French Press* bei 20000 Psi aufgeschlossen (drei Durchgänge). Danach wurde zweimal 30 min bei 4 °C und 30000 × g zentrifugiert, wobei 2/3 des klaren Überstandes weiterverwendet wurden. Anschließend wurde zu dem verbliebenen Überstand soviel 4 M Natriumchlorid hinzugefügt, sodass eine Endkonzentration von 400 mM entstand. Der Extrakt wurde 45 min in einem Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt bei 4 °C gegen 2 L S30-Puffer C dialysiert. Nach 2 h wurde der S30-Puffer C ausgetauscht und über Nacht bei 4 °C dialysiert. Der dialysierte Extrakt wurde 30 min bei 4 °C und 30000 × g zentrifugiert. Etwa 2/3 des klaren Überstandes wurde entnommen, in 350 µL und 250 µL aliquotiert und zuletzt mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Einsatz wurden die S30-Extrakte bei -80 °C aufbewahrt. Zur Qualitätskontrolle der Extrakte wurde das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) in einem analytischen Ansatz hergestellt. Gleichzeitig erfolgte ein Magnesium-*Screen*, um die optimale Magnesium Konzentration für jeden Extrakt herauszufinden.

Analytische zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese im analytischen Maßstab wurde zur Qualitätskontrolle einer neuen Charge S30-Extrakt angewandt sowie zur Überprüfung unterschiedlicher Parameter (Magnesiumkonzentration, Art des Detergens, Konzentration eines bestimmten Detergens) bei der Herstellung neuer Proteine. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die zellfreie Proteinsynthese erfolgte im *Continuous Exchange*-Verfahren mit selbstgebauten Reaktionsgefäßen in einer *24-well* Platte [131]. Dabei lag das *Reaction Mix* zu *Feeding Mix* Verhältnis (RM:FM-Verhältnis) bei 1:15 und beide Kompartimente wurden durch eine semipermeable Membran mit einem *cut-off* von 10 - 14 kDa getrennt.

Das Pipettierschema für ein Magnesium-*Screen* zur Kontrolle eines S30-Extraktes ist in Tabelle 7.6 dargestellt. Zunächst wurde ein Mastermix (MM) für den *Feeding* und den *Reaction Mix* hergestellt. Für die spätere Herstellung des *Reaction Mix* wurde von dem MM etwa 1/15 entnommen. Anschließend wurde zum FM zusätzlich Aminosäuren und der S30-Puffer pipettiert. Die Konzentrationen für das Magnesium-*Screen* lagen zwischen 12 und 20 mM und der *Feeding Mix* wurde, wie in Tabelle 7.7 beschrieben, fertiggestellt. Danach wurde jeweils 850 µL vom FM in die *24-well* Platte gegeben, sodass zehn Reaktionsansätze entstanden. Nach Einsetzen der Reaktionsgefäße mit der semipermeablen Membran wurde der *Reaction*

Mix fertiggestellt. Zu dem RM wurden zunächst die restlichen Komponenten zugefügt und danach die Magnesiumkonzentration (Tabelle 7.7) angepasst. Von dem RM wurde jeweils 55 μL in die Reaktionsgefäße gegeben. Der Ansatz wurde luftdicht mit Parafilm verschlossen und unter Schütteln über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Tabelle 7.6: Pipettierschema für einen analytischen zellfreien Ansatz für 10 Reaktionen.

Komponente	Stock- lösung	End- konz.	MM [μL]	FM [μL]	RM [μL]
NaN_3 (%)	10	0,05	50,8		
PEG8000 (%)	40	2	508,3		
KOAc (mM)	4000	130	330,4		
$\text{Mg}(\text{OAc})_2$ (mM)	1000	7,1	72,2		
HEPES-Puffer (\times)	24	1	372,7		
COMPLETE (\times)	50	1	203,3		
Folsäure (mg/mL)	10	0,1	101,7		
Dithiothreitol (mM)	500	2	40,7		
NTP (\times)	75	1	135,5		
Phosphoenolpyruvat (mM)	1000	20	203,3		
Acetylphosphat (mM)	1000	20	203,3		
Aminosäure-Mix* (mM)	4	0,5	1270,6	1299	
RCWMDE** (mM)	16,7	1	609,9		
			Σ 4103		
Mastermix				3814	289
S30-Puffer (%)	100	35		3308	
Pyruvatkinase (mg/mL)	10	0,08			5,7
<i>E. coli</i> tRNA (mg/mL)	40	0,70			12,5
T7-RNA Pol. (U/ μL)	350	15			30,6
RIBOLock (U/ μL)	40	0,30			5,4
Plasmid	0,2	0,02			53,6
S30-Extrakt (\times)	1	0,35			250,3
			Σ 8421		Σ 647,1

* besteht aus den zwanzig natürlichen Aminosäuren

** L-Arginin, L-Cystein, L-Methionin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure
L-Tryptophan

Tabelle 7.7: Pipettierschema für *Magnesium Screen*.

Reaktion	1	2	3	4	5
Mg ²⁺ -Endkonzentration (mM)	12	14	16	18	20
<i>Feeding Mix</i>					
<i>Mastermix</i> (μ L)	1604	1604	1604	1604	1604
100 mM Mg(OAc) (μ L)	0	36	72	108	144
<i>Aqua bidest.</i> (μ L)	196	160	124	88	52
<i>Reaction Mix</i>					
<i>Mastermix</i> (μ L)	117,6	117,6	117,6	117,6	117,6
100 mM Mg(OAc) (μ L)	0	2,6	5,2	7,8	10,4
<i>Aqua bidest.</i> (μ L)	12,4	9,8	7,2	4,6	2,0

Der Detergenzien-*Screen* wurde auf die gleiche Weise, wie in Tabelle 7.6 beschrieben, durchgeführt. Je nachdem bei welcher Konzentration der eingesetzte S30-Extrakt zuvor im Mg-*Screen* am optimalsten funktioniert hat, wurde der Ansatz bei einer bestimmten Magnesiumkonzentration durchgeführt. Lediglich Art und Konzentration des Detergens wurden variiert (Tabelle 7.8). Die Ansätze (je 55 μ L) wurden entnommen, 1 h auf Eis inkubiert und anschließend gereinigt (Kapitel 7.1.12).

Tabelle 7.8: Eingesetzte Detergenzien für die analytische zellfreie Proteinsynthese.

Detergens	Konzentration
Brij 58 (%)	1,5
Brij 78 (%)	0,8
Digitonin (%)	0,4
DDM (%)	0,1
A8-35 (mg/mL)	0,5 - 2
PMAL-C8 (mg/mL)	0,5 - 2
PMAL-C12 (mg/mL)	0,5 - 2
PMAL-C16 (mg/mL)	0,5 - 2

Präparative zellfreie Proteinsynthese

Für die präparative Herstellung von Proteinen wurden SLIDE-A-LYZER[®] DIALYSIS CASSETTES 0,5 -3 mL mit einem *Cut off* von 10 kDa eingesetzt. Das Gesamtvolumen des präparativen Ansatzes betrug 1 mL und das Verhältnis von RM:FM war 1:17. Das Pipettierschema für einen präparativen Ansatz ist in Tabelle 7.9 dargestellt. Die Präparation sowie die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten ist wie im Abschnitt 7.1.11 beschrieben. Die zusätzlichen Komponenten (Detergens und Wasser) sind hervorgehoben. Der präparative Ansatz wurde anschließend 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Probe (1 mL) wurde entnommen, 1 h auf Eis inkubiert und anschließend gereinigt.

Tabelle 7.9: Pipettierschema für einen präparativen zellfreien Ansatz.

Komponente	Stock- lösung	End- konz.	MM [μ L]	FM [μ L]	RM [μ L]
NaN ₃ (%)	10	0,05	90		
PEG8000 (%)	40	2	900		
KOAc (mM)	4000	130	585		
Mg(OAc) ₂ (mM)	1000	7,1	164		
HEPES-Puffer (×)	24	1	660		
COMPLETE (×)	50	1	360		
Folsäure (mg/mL)	10	0,1	180		
DTT (mM)	500	2	72		
NTP (×)	75	1	240		
PEP (mM)	1000	20	360		
AcP (mM)	1000	20	360		
Aminosäure-Mix* (mM)	4	0,5	2250	2338	
RCWMDE** (mM)	16,7	1	1080		
PMAL-C8 (mg/mL)	50	1	360		
H₂O				1477	73,5
			Σ 7661		
Mastermix				7235	426
S30-Puffer (%)	100	35		5950	
Pyruvatkinase (mg/mL)	10	0,08			8
<i>E. coli</i> tRNA (mg/mL)	40	0,70			17,5
T7-RNA Pol. (U/ μ L)	350	15			42,9
RIBOLock (U/ μ L)	40	0,30			7,5
Plasmid	0,2	0,02			75
S30-Extrakt (×)	1	0,35			350
				Σ 17000	Σ 1000

* besteht aus den zwanzig natürlichen Aminosäuren

** L-Arginin, L-Cystein, L-Methionin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure
L-Tryptophan

7.1.12 Proteinchemie

Reinigung von Proteinen

Die im analytischen Maßstab zellfrei hergestellten Proteine besaßen einen Oligo-Histidin-*Tag* und konnten mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose-*Beads* in Minipräparationssäulen gereinigt werden. In die Säulen wurden 15 μL Ni-Agarose-*Beads* gegeben und einmal mit 400 μL *Aqua bidest.*, dann mit 400 μL Reinigungspuffer I (1 \times) gewaschen. Anschließend wurden die Ni-Agarose-*Beads* in 400 μL Reinigungspuffer I (1 \times) aufgenommen und zu den Proteinproben gegeben. Die Proben wurden 3 h unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Das an die Agarose gebundene Protein wurde auf die Säule aufgetragen und zweimal mit je 75 μL Waschpuffer gewaschen. Danach wurde 80 μL Elutionspuffer (300 mM Imidazol) auf die Probe gegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Protein von der Säule eluiert. Wenn eine Konzentration von 300 mM Imidazol im Elutionspuffer nicht zur Elution des Proteins ausreichte, wurde die Imidazolkonzentration auf 500 mM erhöht.

Die präparativ zellfrei hergestellten Proteine wurden ebenfalls mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose-*Beads* gereinigt. Dazu wurde 200 μL Ni-Agarose-*Beads* zuerst mit *Aqua bidest.* und Reinigungspuffer I (1 \times) gewaschen, dann in 2 mL Reinigungspuffer I (1 \times) aufgenommen und zu der Probe hinzugefügt. Zuvor wurde die Kassette mit 1 mL Reinigungspuffer I (1 \times) ausgespült und ebenfalls zu der Probe gegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 4 mL erhalten wurde. Die Probe wurde über Nacht und unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Probe halbiert und mit unterschiedlichen Detergenzien in den Pufferlösungen gereinigt. Die eine Hälfte wurde mit Pufferlösungen, in dem 0,05 % DDM enthalten ist und die andere Hälfte mit Pufferlösungen, in dem sich 1 mg/mL PMAL-C8 befindet, gereinigt. Zunächst wurde das gebundene Protein zweimal mit 500 μL Waschpuffer gewaschen. Die anschließende Elution erfolgte mit Elutionspuffern mit unterschiedliche Konzentrationen an Imidazol (Tabelle 7.10). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese auf ihre Reinheit überprüft. Fraktionen die das gewünschte Protein enthielten wurden vereinigt und konzentriert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurden zuvor mittels Bradford-Test photometrisch bestimmt.

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe des BIO RAD Protein *Assay* Reagenzes bestimmt.

Tabelle 7.10: Imidazolkonzentrationen zur Elution des präparativ zellfrei hergestellten Proteins.

Imidazolkonzentration [mM]	Volumen [μ L]	Inkubation bei Raumtemp. [min]
100	250	1
200	500	15
300	500	15

Dazu wurde 10 μ L der Proteinprobe mit 790 μ L *Aqua bidest.* und 200 μ L Bradford-Reagenz gemischt. Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm vermessen. Als *Blank* wurde der 1 \times Reinigungspuffer mit dem entsprechenden Detergens verwendet. Eine Kalibriergerade wurde zuvor mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Größenauftrennung der Proteine wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Die Gele wurden selbst angefertigt und bestanden aus einem 15 % Trenngel und einem 5 % Sammelgel (Tabelle 7.11). Die Proben (10 - 200 μ g Protein) wurden mit SDS-Ladepuffer (4 \times) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Marker wurde der PEQGOLD PROTEIN MARKER III verwendet. Anschließend wurde eine Spannung von 160 V angelegt, um die Proben an der Grenze zwischen den beiden Gelen zu sammeln. Danach wurden die Proteine bei 200 V 1,0 - 1,5 h elektrophoretisch getrennt. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder sie wurden für die *Western Blot*-Analyse verwendet. Für die Färbung wurde das Gel etwa 2 h in Coomassie Brilliant Blau Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfärbung des Gels wurde es über Nacht unter Schütteln und bei Raumtemperatur in Entfärbelösung inkubiert.

Western Blot

Für den immunchemischen Nachweis von Proteinen wurden diese zunächst vom SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte im *semi dry*-Verfahren. Dazu wurden auf der Anodenplatte drei zuvor im Transferpuffer getränkte *Whatman* Papiere genau übereinander gelegt. Auf diese kamen die in Methanol aktivierte PVDF-Membran, das SDS-Gel und schließlich drei weitere im Transferpuffer getränkte *Whatman* Papiere. Nach dem Proteintransfer (1 h bei 17 V) wurde die Membran 1 h in 10 mL M-TBS-T (3 %) bei

Tabelle 7.11: Herstellung und Zusammensetzung von zwei SDS-Polyacrylamidgelen.

Komponente [mM]	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
H ₂ O	4,5 mL	2,4 mL
Sammelgelpuffer (4×)		1,0 mL
Trenngelpuffer (4×)	3 mL	
Acrylamidlg. 40 %	4,5 mL	0,6 mL
APS 10 %	80 μL	25 μL
TEMED	10 μL	6 μL

Raumtemperatur und unter Schütteln inkubiert, um die freien Stellen der Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 10 mL Erstantikörper (1:10000 in M-TBS-T) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 - 15 min in TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:10000 in M-TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T für 10 - 15 min gewaschen. Die Entwicklung der Membran erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Chemolumineszenzreaktion mit Hilfe des ECL PLUS WESTERN BLOTTING DETECTION SYSTEM. Die Membran wurde dazu mit dem Reagenz benetzt und gleich darauf mit dem LUMI-IMAGERTMF1 und der LUMIANALYST Software ausgewertet.

Konzentrierung des Proteins

Die Konzentrierung und auch gleichzeitige Imidazolentfernung wurde mittels AMICON[®] ULTRA-4 Zentrifugationsfiltern mit einem *cut off* von 10 kDa durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung in den Filter gegeben und mit dem 1× Reinigungspuffer II (kein Imidazol enthalten!) aufgefüllt und 5 min bei 4 °C 4000 × g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Probe im Filter wurde mit dem 1× Reinigungspuffer II auf 4 mL aufgefüllt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt bis eine Imidazolkonzentration von < 70 mM erreicht war. Das Endvolumen der konzentrierten Proteinlösung betrug 500 - 650 μL. Bei den Proben, die mit PMAL-C8 gereinigt wurden, wurde PMAL-C8 in dem Reinigungspuffer II weglassen, damit PMAL-C8 nicht mitkonzentriert wird.

7.1.13 Fluoreszenzmessungen zur Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen

Die zellfrei hergestellten Proteine sind am C-terminalen Ende an ein GFP gekoppelt. Dadurch kann die richtige Faltung des zu untersuchenden Proteins anhand der Fluoreszenz kontrolliert werden. Fluoreszenz kann nur bei der richtigen Faltung des GFPs bzw. des Proteins erfolgen.

In-Gel-Fluoreszenzmessungen

Die Proben wurden, wie im Abschnitt 7.1.12 veranschaulicht, behandelt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde im LUMI-IMAGERTMF1 bei einer Wellenlänge von $\lambda = 520$ nm belichtet und mit der LUMIANALYST Software ausgewertet.

Messungen am Fluorimeter

Zur Kontrolle der Qualität des S30-Extraktes wurde GFP im analytischen zellfreien Ansatz (Abschnitt 7.1.11) hergestellt. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität vom GFP kann die optimale Magnesiumkonzentration für den S30-Extrakt ermittelt werden. Dazu wurden 200 μ L einer 1:1000 verdünnten Probe in eine OPTI PLATETM-96 pipettiert. Die Platte wurde am Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm vermessen.

7.1.14 Rekonstitution von Proteinen in Liposomen

Die Herstellung der Liposomen sowie die Rekonstitution von Proteinen wurden in Anlehnung an unterschiedliche bekannte Methoden vorgenommen [44, 132, 133].

Herstellung von Liposomen

Für einen Rekonstitutionsansatz wurden 12 mg *E. coli polar lipids* in Diethylether gelöst. Das gelöste Lipid wurde mit Stickstoff begast. Dabei wurde das Gefäß so schnell gedreht, dass sich das Lipid gleichmäßig an der Gefäßwand verteilte und sich ein dünner Film bildete. Nach weiteren 2 h Stickstoffbegasung wurden einige Glasperlen und 2 mL Messpuffer zugegeben und vorsichtig gevortext, um die Liposomen zu resuspendieren.

Rekonstitution von Proteinen in Liposomen

Zur Destabilisierung der resuspendierten Lipide wurden 400 μL Triton X (10 %) langsam zugetropft und gevortext. Wenn nach Zugabe von 400 μL Triton X keine klare Lösung entstanden war, wurde mehr Triton X dazupipettiert bis eine klare Lösung erhalten wurde.

Von der Proteinlösung wurden 400 μL entnommen, und mit soviel Lipidlösung vermischt, sodass sich ein Lipid/Protein *Ratio* von 1:10 ergab. Der Rekonstitutionsansatz wurde 30 min bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zu 300 mg aktivierte BIO-BEADS[®]SM-2 gegeben, um die eingesetzten Detergenzien zu entfernen. Nach Inkubation bei 4 °C und unter Schütteln, wurden die BIO-BEADS[®]SM-2 gewechselt und erneut 2 h bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und 40 min bei 4 °C und 45000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 100 - 150 μL Messpuffer resuspendiert, zu je 10 μL aliquotiert und bis zur Messung am SURFE²R bei -80 °C eingefroren.

Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Die Saccharose-Gradienten-Zentrifugation wurde in Anlehnung an Yakata *et al.* [134] durchgeführt, um die Effizienz der Rekonstitution zu überprüfen. Dafür wurde 60 μg Protein in 350 μL Gradientenpuffer und in 350 μL Saccharose (60 %) suspendiert. Die Mischung wurde in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben und mit Gradientenpuffer mit jeweils unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen überschichtet. Insgesamt wurde die Mischung mit fünf weiteren 700 μL -Fraktionen überschichtet. Die Überschichtung erfolgte mit abnehmender Konzentration der Saccharose (25, 20, 15, 5 und 0 %). Mit einem SW 60 Ti- Schwingrotor wurde die überschichtete Saccharose bei 4 °C und 164000 $\times g$ über 6 h zentrifugiert. Anschließend wurde die einzelnen Schichten abpipettiert und das Protein gefällt. Für diesen Zweck wurden die einzelnen Fraktionen mit 700 μL Trichloressigsäure (10 %) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 4 °C und 15900 $\times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 μL SDS-Puffer (4 \times) suspendiert und mit 1 μL Ammoniak (32 %) versetzt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert (Kapitel 7.1.12).

7.2 Chemische Synthesen

7.2.1 Chemikalien

ABCR, Karlsruhe

Bis(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphine

Acros Organics, Geel, Belgium

O-Methyl-L-tyrosin

Alfa Aesar, Karlsruhe

Aluminiumchlorid (wasserfrei), Calciumhydrid (92 %), Cäsiumcarbonat, 1,5-Dibrompentan (98 %), Iodmethan, 4-Iod-L-phenylalanin, Lithiumaluminiumhydrid (97 %), *p*-Methoxybenzylalkohol, 2-Methoxyhydrochinon (97 %), 4-Pentensäure, *p*-Nitrophenylchloroformia (97 %), 2,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (97 %)

emp Biotech GmbH, Berlin

5-Benzylmercapto-1*H*-tetrazol

FAGRON, Barsbrüttel

N-Acetylcystein

Fluka, München

Adenosin, Fluorescein, Orthoameisensäuretriethylester, *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat

Merck, Darmstadt

Ammoniak (25 %), Benzoylchlorid (99 %), *tert*-butyldiphenylsilylchlorid, Chloracetonitril, *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (99 %), Ethylacetoacetat, *N*-Hydroxysuccinimid, Iod, Piperidin, Triphenylmethan,

Roth, Karlsruhe

Adenosin, Ammonium D4 Deuteroxid, 25 wt.% Lösung in D₂O, Chloroform D1 mit TMS (0,03 Vol.%) stab. mit Silber, Dimethylsulfoxid D6, Methanol D4, Triethylamin, Zitronensäure (wasserfrei),

SAFC[®] Proligo[®] Reagents,

Activator 42 Solution (0,25 M in Acetonitril, 5-[Bis(trifluormethyl)phenyl]-1*H*-tetrazol)

Sigma-Aldrich, München

tert-Butylhydroperoxid, Chloracetonitril, 4-Cyanophenol, 1,5-Dibromheptan, Trimethylaluminium (2 M Lösung in Toluol)

7.2.2 Geräte

NMR-Spektrometer

Bruker Aavance III 300 (Bruker, Rheinstetten)

¹H-NMR Messfrequenz = 300 MHz

¹³C-NMR Messfrequenz = 75 MHz

³¹P-NMR Messfrequenz = 121 MHz

¹H-NMR-Spektren und ¹³C-Spektren wurden bei 300 K und in Deuteriochloroform (CDCl₃) mit Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard gemessen. Weiterhin wurde Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆) als Lösungsmittel verwendet, wobei die nicht deuterierte Verbindung als Referenz diente. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben. Die Kopplungskonstanten *J* werden in Hertz (Hz) angegeben. Für die Multiplizitäten im ¹H-NMR sind folgende Abkürzungen verwendet worden: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett) sowie Kombinationen daraus. Zusätzlich wurden einige Signale mittels zweidimensionaler Spektroskopie (COSY, HSQC, HMBC) zugeordnet.

Massenspektrometer

ESI-MS Esquire-LC (Bruker Daltonik, Bremen)

Der Probeneinlass erfolgte per HPLC (Agilent, Waldbronn). Alle Signale sind in Masse pro Ladung *m/z* angegeben.

FT-IR-Spektrometer

Perkin Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer, Waltham, USA)

HPLC

WATERS 717 mit Autosampler

Pumpe: *WATERS* 1525 Binary HPLC Pump

Säule: Thermo Scientific ODS-2 Hypersil C18; 5 μm ; 250 \times 4.6 mm

Detektor: *WATERS* 486 Tunable Absorbance Detector

Auswertesystem: *WATERS BREEZE*

Fluoreszenzspektrometer

Fluorescence Spectrometer Perkin Elmer precisely LS 55 (Perkin Elmer, Waltham, USA)

Gefriertrockner

ALPHA2-4 (Christ, Osterode)

7.2.3 Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden bei Bedarf gereinigt und getrocknet. Wasserfreie Lösungsmittel wurden über dem angegebenen Trockenmittel unter Rückfluss erhitzt und sofort nach der Destillation eingesetzt:

Lösungsmittel	Trocknungsmittel/Indikator	Firma
Aceton	Kaliumcarbonat	Walter CMP
Acetonitril		Walter CMP
Chloroform		Walter CMP
Cyclohexan		Walter CMP
Dichlormethan	Calciumhydrid	Walter CMP
Diethylether	Natriumhydrid	Walter CMP
<i>N,N</i> -Dimethylformamid		Alfa Aesar
Dioxan		Walter CMP
Essigsäureethylester		Walter CMP
Ethanol		J. T. Baker
Methanol	Magnesiumspäne	J. T. Baker
Pyridin		Roth
Tetrahydrofuran	Lithiumaluminiumhydrid/ Triphenylmethan	Merck
Toluol	Calciumhydrid	

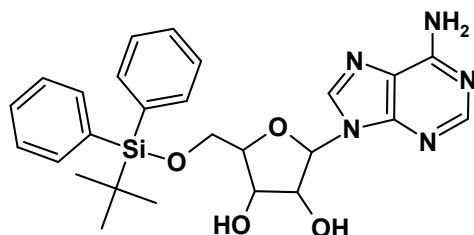
7.2.4 Absorbenzien für Chromatographie und Filtration, Trockenmittel

Adsorbentien/Trocknungsmittel	Firma
DC-Polyesterfolien, Polygram [®] Sil G/UV ₂₅₄	Macherey-Nagel
Kieselgel 60 für Säulenchromatographie, Korngrösse 0,2 - 0,063 mm	Macherey-Nagel
Calciumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Natriumsulfat	Roth

7.3 Synthesen

7.3.1 Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Proteine

5'-O-tertbutyldiphenylsilyladenosin (**3**)

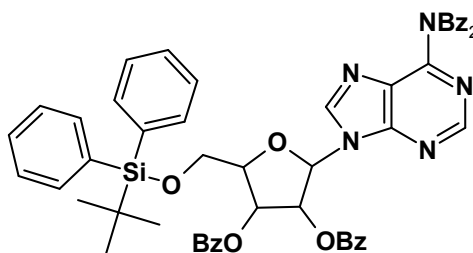


Unter Stickstoff-Atmosphäre wurde 3,00 g (11,2 mmol) Adenosin (**2**) in 80 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend wurde bei 0 °C 3,60 mL (14,1 mmol) Tertbutyldiphenylsilylchlorid zugetropft. Die Kühlung wurde weggenommen und der Ansatz bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Zu der Lösung wurde 20 mL Methanol zugegeben und 10 min bei Raumtemp. weitergerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 1 L Ethylacetat und 200 mL Wasser aufgenommen. Die org. Phase wurde mit 100 mL dest. Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3,69 g (5,39 mmol, 64 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8,26$ (s, 1H, Ad-*H*), 8,12 (s, 1H, Ad-*H*), 7,62 (m_c , 4H, Ar-*H*), 7,49 - 7,35 (m, 6H, Ar-*H*), 7,26 (bs, 2H, NH_2), 5,95 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, Rib-*H-1*), 5,52 (d, 1H, $J = 5,70$ Hz, *OH*), 5,22 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz, *OH*), 4,67 (q, 1H, $J = 5,4$ Hz, Rib-*H-2*), 4,36 (q, 1H, $J = 5,1$ Hz, Rib-*H-3*), 4,06 (q, 1H, $J = 4,3$ Hz, Rib-*H-4*), 3,95 (dd, 1H, $J = 11,2$ Hz, $J = 3,8$ Hz, Rib-*H-5*), 3,80 (dd, 1H, $J = 11,2$ Hz, $J = 3,8$ Hz, Rib-*H-5*), 1,00 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

MS (ESI): $m/z = 506$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

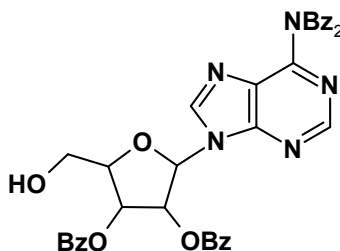
***N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-Tetrabenzoyl-5'-O-tertbutyldiphenylsilyladenosin (4)**

In 120 mL trockenem Dichlormethan und 70 mL abs. Pyridin wurde 10 g (19,8 mmol) 5'-O-tertbutyldiphenylsilyladenosin (**3**) gelöst. Bei 0 °C wurde 9,5 mL (81,9 mmol) Benzoylchlorid, gelöst in 10 mL trockenem Dichlormethan, zugegeben. Nach 3 h Rühren bei 0 °C wurde weitere 9,5 mL (81,9 mmol) Benzoylchlorid, gelöst in 10 mL Dichlormethan, zugegeben. Der Ansatz wurde langsam auf Raumtemp. gebracht und über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter Rühren auf 500 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben. Die wässr. Phase wurde mit 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wurde mit 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und 100 mL dest. Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1, $R_f = 0,12$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 15,3 g (16,6 mmol, 84 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,59$ (s, 1H, Ad-*H*), 8,37 (s, 1H, Ad-*H*), 8,07 - 7,97 (m, 2H, Ar-*H*), 7,93 - 7,84 (m, 6H, Ar-*H*), 7,70 - 7,66 (m, 4H, Ar-*H*), 7,62 - 7,28 (m, 18H, Ar-*H*), 6,56 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, Rib-*H-1*), 6,24 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, Rib-*H-2*), 6,11 (dd, 1H $J = 5,7$ Hz, $J = 3,6$ Hz, Rib-*H-3*), 4,55 (q, 1H, $J = 3,4$ Hz, Rib-*H-4*), 4,12 - 4,01 (2 \times dd, 2H, Rib-*H-5*), 1,12 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

MS (ESI): $m/z = 922$ [M]⁺.

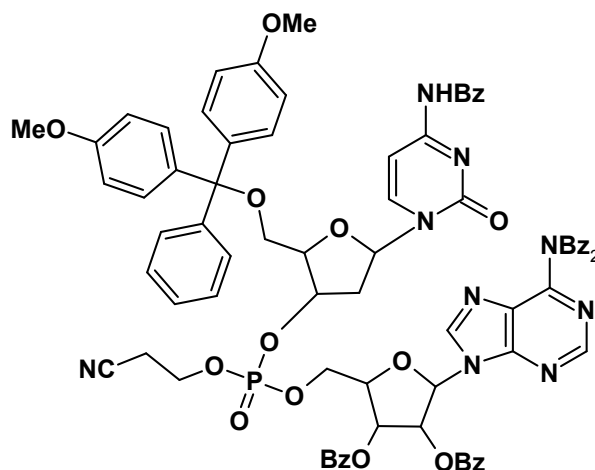
***N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-Tetrabenzoyladenosen (5)**

In 40 mL Tetrahydrofuran wurden 15,7 g (16,6 mmol) *N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-Tetrabenzoyl-5'-O-tertbutyldiphenylsilyladenosen (4) und 5,8 g (18,3 mmol) Tetra-*n*-butylammoniumfluorid Trihydrat gelöst und 30 min bei Raumtemp. gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC kontrolliert. Nach 1 d Rühren bei Raumtemp wurden 300 mL dest. Wasser zugegeben. Die wässr. Phase wurde zweimal mit je 100 mL Dichlormethan und einmal mit je 100 mL Dichlormethan/Pyridin (10:1) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden einmal mit 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit 100 mL dest. Wasser gewaschen. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol, 97:3, $R_f = 0,37$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6,40 g (9,36 mmol, 60 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,69$ (s, 1H, Ad-*H*), 8,22 (s, 1H, Ad-*H*), 8,04 (m_c, 2H, Ar-*H*), 7,86 (m_c, 6H, Ar-*H*), 7,48 (m_c, 12H, Ar-*H*), 6,38 (m_c, 1H, Rib-*H*-1, *H*-2), 6,06 (dd, 1H $J = 4,9$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Rib-*H*-3), 5,53 (s, 1H, OH), 4,63 (m_c, Rib-*H*-4), 4,06 (m_c, 2H, Rib-*H*-5) ppm.

[*N*⁴-Benzoyl-5'-O-(4',4''-dimethoxytrityl)-2'-desoxycitidyl]-(3',5')- β -cyanoethyl)-phosphatidyl-[*N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-tetrabenzoyladenosen] (15)

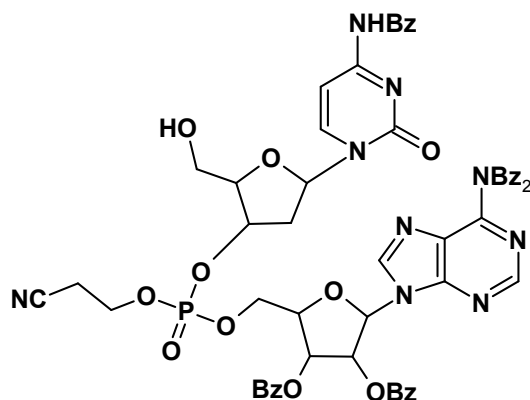


Unter Argon-Atmosphäre wurden in 100 mL trockenem Acetonitril 5,37 g (6,44 mmol) CBz (**8**), 4,00 g (5,85 mmol) *N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-Tetrabenzoyladenosen (**5**) und 3,37 g (16,55 mmol) 5-Benzylmercapto-1*H*-tetrazol (**11**) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde 16 h bei Raumtemp. gerührt. Bei 0 °C wurde 5,60 mL (29,3 mmol, 5,5 M Lösung in Decan) *tert*-Butylhydroperoxid langsam zugetropft. Es wurde 30 min bei 0 °C und anschließend 2,5 h bei Raumtemp gerührt. Anschließend wurde 100 mL Dichlormethan und 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung dazugegeben. Die wässr. Phase wurde dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol, zunächst 98:2, dann 95:5, $R_f = 0,38$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5,24 g (3,66 mmol, 63 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,70, 8,69$ (2 x s, 1H, Ad-*H*), 8,24, 8,38 (2 x s, 1H, Ad-*H*), 8,11 (m_c, 1H, Cyt-*H*), 7,89 (m_c, 11H, Ar-*H*, Cyt-*H*), 7,54 (m_c, 9H, Ar-*H*), 7,31 (m_c, 23H, Ar-*H*), 6,85 (m_c, 4H, Ar-*H*), 6,52 (2 x d, 1H, Ad-*H*-1), 6,26 (m_c, 2H, Cyt-*H*-1, Ad-*H*-2), 6,13 (m_c, 1H, Ad-*H*-3), 5,15 (m_c, 1H, Cyt-*H*-3), 4,70 (m_c, 1H, Ad-*H*-4), 4,53 (m_c, 2H, Ad-*H*-5), 4,40 - 4,04 (m, 3H, Cyt-*H*-4), POCH₂CH₂), 3,88 (2 x d, 2H, Ad-*H*-5), 3,78, 3,76 (2 x s, 6H, OCH₃), 2,71 (m_c, 1H, Cyt-*H*-2), 2,60 (m_c, 3H, Cyt-*H*-2, POCH₂CH₂CN), 2,36 (m_c, 1H, Cyt-*H*-2) ppm.

**[*N*⁴-Benzoyl-2'-desoxycytidyl]-(3',5')- β -cyanoethyl)-phosphatidyl-
[*N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-tetrabenzoyladenosenin] (16)**



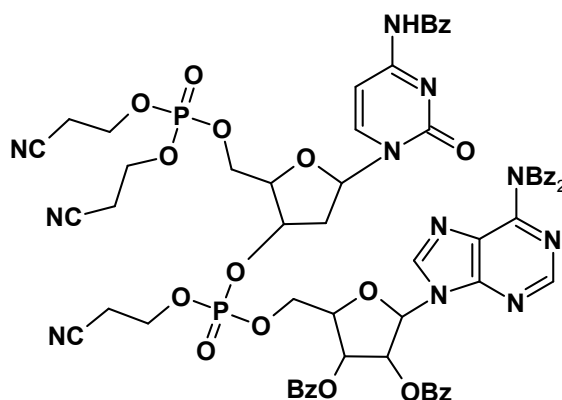
In 100 mL Dichlormethan/Ethanol (1:1) wurden 3,13 g (2,19 mmol) [*N*⁴-Benzoyl-5'-O-(4',4''-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidyl]-(3',5')- β -cyanoethyl)-phosphatidyl-[*N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-tetrabenzoyladenosenin] (**15**) und 2,49 g (13,1 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure gelöst und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Der Reaktionsansatz wurde zu 150 mL eiskaltem ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben. Die wässr. Phase wurde dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurde mit 100 mL dest. Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (1 - 5 % Ethanol in Dichlormethan, $R_f = 0,42$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,56 g (1,38 mmol, 63 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,83$ (bs, 1H, NH), 8,71, 8,70 (2 x s, 1H, Ad-*H*), 8,52, 8,51 (2 x s, 1H, Ad-*H*), 8,23, 8,20 (2 x d, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 7,6$ Hz, Cyt-*H*), 7,97 - 7,83 (m, 10H, Ar-*H*), 7,61 - 7,33 (m, 16H, Ar-*H*, Cyt-*H*), 6,57, 6,55 (2 x d, 1H, $J = 4,9$ Hz, $J = 4,9$ Hz, Ad-*H-1*), 6,33 - 6,20 (m, 2H, Ad-*H-2*, Cyt-*H-1*), 6,18 - 6,13 (m, 1H, Ad-*H-3*), 5,19 - 5,08 (2 x m, 1H, Cyt-*H-3*), 4,72 - 4,71 (m, 1H, Ad-*H-4*), 4,63 - 4,52 (m, 2H, Ad-*H-5*), 4,33 - 4,30 (m, 1H, Cyt-*H-4*), 4,30 - 4,18 (m, 2H, POCH₂), 3,84 - 3,74 (m, 2H, Cyt-*H-5*), 3,68, 3,54 (2 x bs, 1H, OH), 2,83 - 2,72 (m, 3H, Cyt-*H-2*, CH₂CN), 2,49 - 2,32 (m, 1H, Cyt-*H-2*) ppm.

MS (ESI): $m/z = 1130$ [M + H]⁺.

[*N*⁴-Benzoyl-5'-O-(di-β-cyanoethylphosphin)-2'-desoxycytidyl]-(3',5')-β-cyanoethyl)-phosphatidyl-[*N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-tetrabenzoyladenosen] (17)

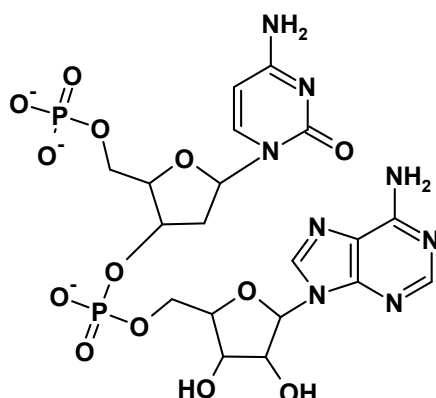


In 100 mL trockenem Acetonitril wurden 1,00 g (0,89 mmol) [*N*⁴-Benzoyl-2'-desoxycytidyl]-(3',5')-β-cyanoethyl)-phosphatidyl-[*N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-tetrabenzoyladenosen] (**16**) und 341 mg (1,77 mmol) 5-Benzylmercapto-1*H*-tetrazol (**11**) gelöst. Unter Argon-Atmosphäre wurde 479 mg (1,77 mmol) Bis(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphin dazugegeben und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurden 805 μL (4,43 mmol, 5,5 M Lösung) *tert*-Butylhydroperoxid zugegeben und 3 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 50 ml Dichlormethan wurde die org. Phase zweimal mit je 50 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatografischer Reinigung wurde an Kieselgel (1 - 5 % Methanol in Dichlormethan, $R_f = 0,28$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 428 mg (0,33 mmol, 37 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,71 (s, 1H, Ad-*H*), 8,54, 8,51 (2 x s, 1H, Ad-*H*), 8,03 - 7,83 (m, 11H, Cyt-*H*, Ar-*H*), 7,63 - 7,46, 7,42 - 7,40 (2 × m, 16H, Cyt-*H*, Ar-*H*), 6,58, 6,56 (2 x d, 1H, $J = 4,9$ Hz, $J = 4,7$ Hz, Ad-*H-1*), 6,33 - 6,15 (m, 3H, Ad-*H-1*, *H-3*, Cyt-*H-1*), 5,19 - 5,12 (m, 1H, Cyt-*H-3*), 4,73 - 4,71 (m, 1H, Ad-*H-4*), 4,60 - 4,57 (m, 2H, Ad-*H-5*), 4,46 - 4,27 (m, 9H, Cyt-*H-4*, *H-5*, POCH₂), 2,90 - 2,73 (m, 7H, Cyt-*H-2*, CH₂CN), 2,39 - 2,24 (m, 1H, Cyt-*H-2*) ppm.

MS (ESI): $m/z = 1316$ [M + H]⁺.

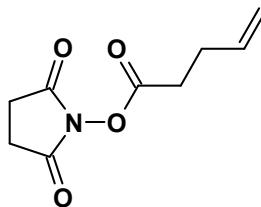
5'-Phospho-2'-desoxycytidyl(3'-5')adenosin (1)

In 3 mL Dioxan und 15 mL Methanol wurde 500 mg (0,38 mmol) [*N*⁴-Benzoyl-5'-O-(di- β -cyanoethylphosphin)-2'-desoxycytidyl]-(3',5')- β -cyanoethyl)-phosphatidyl-*N*⁶,*N*⁶,2',3'-O-tetrabenzoyladenosin] (**17**) gelöst. Nach Zugabe von 18 mL 32 % Ammoniaklösung wurde der Kolben mit einem Plastikstopfen verschlossen. Der Ansatz wurde 3 d bei Raumtemp gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 10 mL dest. Wasser aufgenommen und dreimal mit je 10 mL Chloroform gewaschen. Die wässr. Phase wurde gefriergetrocknet und ein weißer Feststoff wurde erhalten. Um das Tetrabutylammoniumsalz zu erhalten wurde eine Ionenaustauschchromatografie durchgeführt. Nach Gefriertrocknung wurde das Produkt **1** als Tetrabutylammoniumsalz erhalten.

Ausbeute: 243 mg (0,61 mmol, 73%).

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 8,44 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,46 (d, 1H), 5,91 (d, 1H), 5,83 (d, 1H), 4,49 (m, 2H), 4,29 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,87 (m, 2H), 3,62 (m, 2H), 1,68 (m, 1H) ppm. (Im Spektrum waren noch Verunreinigungen zu sehen.)

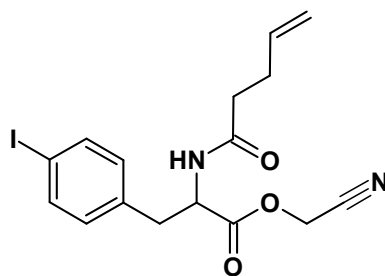
MS (ESI): $m/z = 637 [M + H]^+$.

4-Pentenoylhydroxysuccinimid (**20**)

In 50 mL Dichlormethan wurden 2 mL (19,6 mmol) 4-Pentensäure (**22**) und 2,82 g (24,5 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid (**21**) vorgelegt. Zu der Suspension wurde portionsweise 5,15 g *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Der Ansatz wurde 1,5 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde der entstandene weiße Niederschlag abfiltriert. Der Filterkuchen wurde mehrmals mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Chloroform/Methanol, 99:1, $R_f = 0,5$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,88 g (14,6 mmol, 60 %), Lit. [88]: 82 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,85$ (ddt, 1H, $J = 16,7$ Hz, $J = 10,3$ Hz, $J = 6,5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,12 (m_c , 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 2,83 (s, 4H, COCH_2), 2,72 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, COOCH_2), 2,48 (m_c , 2H, COOCH_2) ppm.

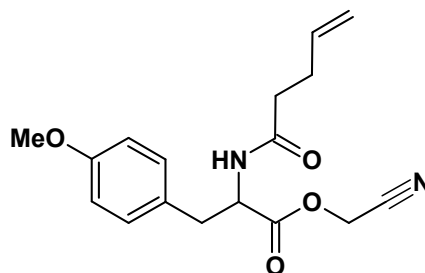
N-4-Pentenoyl-*p*-Iod-L-phenylalanin-cyanomethylester (23)

Zu der Suspension aus 291 mg (1 mmol) 4-Iodphenylalanin (**18**) und 168 mg (2 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 3 mL dest. Wasser und 3 mL Dioxan wurde 217 mg (1 mmol) 4-Pentenoyloxysuccinimid (**20**) gegeben. Der Ansatz wurde 16 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde 25 mL 1 N Natriumhydrogensulfatlösung zugegeben. Die wässr. Phase wurde dreimal mit je 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL Acetonitril und 0,7 mL Triethylamin aufgenommen. Zu der Lösung wurde 0,31 mL (5 mmol) Chloracetonitril gegeben und 20 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde 25 mL Ethylacetat zugegeben und die org. Phase wurde zweimal mit je 25 mL 1 N Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1, $R_f = 0,3$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 251 mg (0,61 mmol, 61%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,65$ (m, 2H, Ar-*H*), 6,89 (m, 2H, Ar-*H*), 5,85 - 5,70 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, NH), 5,08 - 4,99 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,94 (q, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,71 (dd, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CN}$), 3,09 (m, 2H, CH_2), 2,40 - 2,26 (m, 4H, $\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)$) ppm.

MS (ESI): $m/z = 413$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

***N*-4-Pentenoyl-*p*-Methoxy-*L*-phenylalanin-cyanomethylester (24)**

Zu einer Suspension aus 195 mg (1 mmol) 4-Methoxy-*L*-phenylalanin (**19**) und 168 mg (2 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 3 mL dest. Wasser und 3 mL Dioxan wurde 217 mg (1,1 mmol) 4-Pentenoyloxysuccinimid (**20**) gegeben. Der Ansatz wurde 16 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde 25 mL 1 N Natriumhydrogensulfatlösung zugegeben. Die wässr. Phase wurde dreimal mit je 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL Acetonitril und 0,7 mL Triethylamin aufgenommen. Zu der Lösung wurde 0,31 mL (5 mmol) Chloracetonitril gegeben und 20 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde 25 mL Ethylacetat zugegeben und die org. Phase wurde zweimal mit je 25 mL 1 N Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Ethylacetat/Cyclohexan, 4:1, $R_f = 0,7$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 242 mg (0,76 mmol, 76 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,02$ (m_c , 2H, Ar-*H*), 6,86 (m_c , 2H, Ar-*H*), 5,79 (m_c , 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,02 (m , 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,88 (q , 1H, CH-NH), 4,74 (dd , 2H, OCH_2CN), 3,79 (s , 3H, OCH_3), 3,08 (m_c , 2H, $\text{CH}_2\text{CH-NH}$), 2,32 (m_2 , 4H, $(\text{CH}_2)_2\text{-CH}=\text{CH}_2$) ppm.

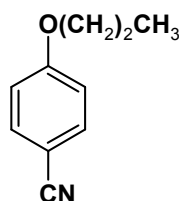
MS (ESI): $m/z = 317$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

7.3.2 Synthese der Pentamidin-Analoga

Aluminium-Reagenz (32) als 1,25 M Lösung in Toluol

In 11 mL trockenem Toluol wurde 2,02 g (0,038 mmol) Ammoniumchlorid (**31**) suspendiert und auf 0 °C gebracht. Anschließend wurde 19 mL (0,038 mmol) Trimethylaluminium (**30**, 2M in Hexan) langsam zugetropft. Danach wurde die Eiskühlung weggenommen und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemp. gerührt. Die Suspension kann sofort eingesetzt werden oder bis zum Einsatz bei -20 °C gelagert werden.

4-*n*-Propoxybenzonnitril (**36**)

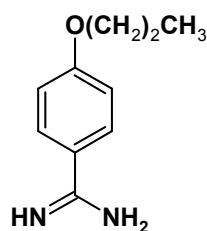


In 40 mL Aceton wurden 1,20 g (10 mmol) 4-Hydroxybenzonnitril (**30**), 5,50 g (40 mmol) Kaliumcarbonat und 1,48 g (12 mmol) *n*-Brompropan (**34**) über Nacht unter Rückfl. erhitzt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat, 95:5) und ein weißer Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 1,06 g (6,60 mmol, 55 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7,56 (d, 2H, J = 9,0 Hz, Ar-*H*), 6,92 (d, 2H, J = 9,0 Hz, Ar-*H*), 3,95 (t, 2H, J = 6,6 Hz, OCH₂), 1,82 (sextett, 2H, OCH₂CH₂), 1,04 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃) ppm.

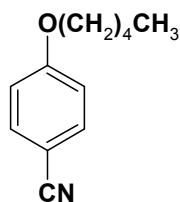
MS (ESI): m/z = 162 [M + H]⁺.

4-*n*-Propoxybenzamidin (28)

In 5 mL trockenem Toluol wurde 1,06 g (6,60 mmol) 4-*n*-Propoxybenzonitril (**36**) gelöst. Zu der Lösung wurde langsam 15,7 mL (19,6 mmol) Aluminiumreagenz **32** zuge tropft und über Nacht bei 80 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Eiskühlung zu einer Suspension aus 10 g Kieselgel und 95 mL Dichlormethan gegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemp. wurde das Kieselgel abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt und der erhaltene Rückstand wurde in einer Mischung aus Dichlormethan/Methanol (9:1) aufgenommen. Der Feststoff wurde abgesaugt und die Mutterlauge eingedampft. Der so erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Ethylacetat/Methanol, 9:1).

Ausbeute: 150 mg (0,841 mmol, 13 %).

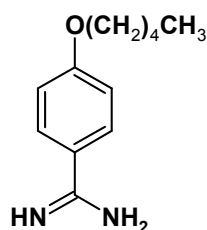
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ = 9,29, 9,16 (2 x s, 4H, Amidin), 7,89 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz, Ar-*H*), 7,13 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz, Ar-*H*), 4,04 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, OCH₂), 1,75 (sext, 2H, OCH₂CH₂), 0,98 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH₃) ppm.

4-*n*-Pentoxybenzonnitril (**37**)

In 40 mL Aceton wurden 1,20 g (10 mmol) 4-Hydroxybenzonnitril (**30**), 5,50 g (40 mmol) Kaliumcarbonat und 1,81 g (12 mmol) *n*-Brompentan (**35**) über Nacht unter Rückfl. erhitzt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 95:5) gereinigt und ein weißer Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 1,51 g (8,00 mmol, 66 %).

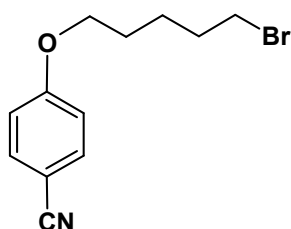
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,56$ (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, Ar-*H*), $6,92$ (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, Ar-*H*), $3,99$ (t, 2H, OCH_2), $1,79$ (quint, 2H, OCH_2CH_2), $1,41$ (m_c , 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{H}_2)_2$), $0,93$ (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3) ppm.

4-*n*-Pentoxybenzamidin (29)

In 5 mL trockenem Toluol wurde 1,51 g (8,00 mmol) 4-*n*-Pentoxybenzonitril (**37**) gelöst. Zu der Lösung wurde langsam 19,2 mL (24,0 mmol) Aluminiumreagenz **32** zugetropft und über Nacht bei 80 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Eiskühlung zu einer Suspension aus 10 g Kieselgel und 95 mL Dichlormethan gegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemp. wurde das Kieselgel abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt und der erhaltene Rückstand wurde in einer Mischung aus Dichlormethan/Methanol (9:1) aufgenommen. Der Feststoff wurde abgesaugt und die Mutterlauge eingedampft. Der so erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Ethylacetat/Methanol, 9:1).

Ausbeute: 500 mg (2,42 mmol, 30 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 9,31, 9,16$ (2 x s, 4H, Amidin), 7,88 (d, 2H, $J = 9,1$ Hz, Ar- H), 7,13 (d, 2H, $J = 9,1$ Hz, Ar- H), 4,07 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, OCH_2), 1,73 (quint, 2H, OCH_2CH_2), 1,37 (m_c , 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{H}_2)_2$), 0,89 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH_3) ppm.

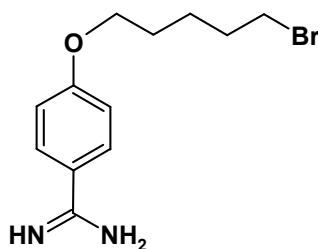
1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (44)

In 80 mL trockenem Aceton wurden 7,50 g (0,05 mol) Kaliumcarbonat und 9,70 mL (0,07 mol) 1,5-Dibrompentan (**51**) suspendiert und unter Rückfl. erhitzt. In 20 mL Aceton wurde 8,00 g (0,07 mol) 4-Cyanophenol (**33**) gelöst und innerhalb von 2 - 2,5 h zum Ansatz langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde weitere 2,5 h unter Rückfl. erhitzt und anschließend 16 h bei Raumtemp. gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Aceton gespült. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde in 50 mL Chloroform aufgenommen. Die org. Phase wurde einmal mit 50 mL dest. Wasser, zweimal mit je 50 mL 1 M Natriumhydroxidlösung und einmal mit 50 mL dest. Wasser gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2, $R_f = 0,35$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4,08 g (15,2 mmol, 21%), Lit.[104]: 55 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,57$ (d, 2H, Ar-H), 6,93 (d, 2H, Ar-H), 4,02 (t, 2H, OCH_2), 3,42 (t, 2H, CH_2Br), 1,80 (m_c , 6H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_3$) ppm.

4-(1-Brompentoxy)-benzamidin (45)

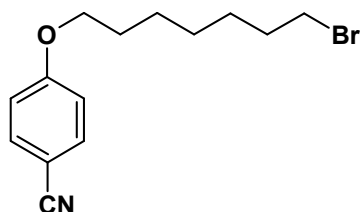


In 12 mL trockenem Toluol wurden 3,4 mg (12,5 mmol) 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)-pentan (**44**) und 20 mL (25 mmol) Aluminiumreagenz **32** (1,25 M Lösung in Toluol) suspendiert. Der Ansatz wurde 16 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wurde die Reaktionsmischung zu einer Suspension aus 60 mL eisgekühltem Chloroform und 8 g Kieselgel gegeben. Es wurde 30 min bei Raumtemp. gerührt. Das Kieselgel wurde abfiltriert und der Filterkuchen wurde mit 80 mL Methanol gespült. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde in 40 mL Dichlormethan/Methanol (9:1) aufgenommen und erneut filtriert. Der Filterkuchen wurde mit 40 mL Dichlormethan/Methanol (9:1) gespült. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol, 9:1, $R_f = 0,30$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,17 g (4,11 mmol, 33 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9,17, 8,81$ ($2 \times \text{s}$, 3H, Amidin), 7,82 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar-*H*), 7,15 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz, Ar-*H*), 4,10 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, OCH_2), 3,67 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, CH_2Br), 1,92 - 1,70, 1,63 - 1,49 ($2 \times \text{m}_c$, 6H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_3$) ppm.

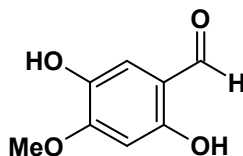
MS (ESI): $m/z = 286$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

1-Brom-7-(4-cyanophenoxy)heptan (**54**)

In 20 mL trockenem Aceton wurde 2,34 g (16,9 mmol) Kaliumcarbonat suspendiert. Zu der Suspension wurde und 5,44 mL (31,9 mmol) 1,7-Dibromheptan (**53**) gegeben und unter Rückfl. erhitzt. 2,56 g (21,5 mmol) 4-Cyanophenol (**33**) wurden in 15 mL trockenem Aceton gelöst und innerhalb von 2 h zum Ansatz langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde weitere 2,5 h unter Rückfl. erhitzt und anschließend 16 h bei Raumtemp. gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Aceton gespült. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand in 30 mL Chloroform aufgenommen. Die org. Phase wurde einmal mit 30 mL dest. Wasser, einmal mit 50 mL 1 M Natriumhydroxidlösung und einmal mit 30 mL dest. Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 8:2) gereinigt und ein weißer Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 1,42 g (4,78 mmol, 22 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,57$ (d, 2H, Ar-*H*), 6,93 (d, 2H, Ar-*H*), 3,99 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz, OCH_2), 3,42 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, CH_2Br), 1,84 (m_c , 4H, CH_2), 1,44 (m_c , 6H, CH_2) ppm.

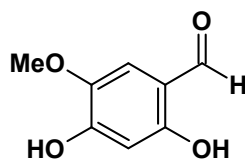
2,5-Dihydroxy-4-methoxybenzaldehyd (49)

In 5 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid wurden 1,24 g (8,05 mmol) 2,4,5-Trihydroxybenzaldehyd (**48**) und 3,00 g (9,21 mmol) Cäsiumcarbonat suspendiert. Unter Argon-Atmosphäre wurde bei 0 °C 600 μ L (9,73 mmol) Methyljodid zugetropft. Die Suspension wurde 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 16 h bei Raumtemp. gerührt. Die Suspension wurde vorsichtig zu 6 mL 10 N Salzsäure gegeben und 30 min bei Raumtemp. gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und viermal mit je 3 mL dest. Wasser und dreimal mit je 4 mL Methanol gewaschen. Nach Trocknen i. Vak. wurde ein hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 448 mg (2,66 mmol, 33 %), Lit.[103]: 60 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 10,55 (s, 1H, Aldehyd), 9,99 (s, 1H, OH), 8,92 (s, 1H, OH), 7,05 (s, 1H, Ar-*H-6*), 6,55 (s, 1H, Ar-*H-3*), 3,87 (s, 3H, OCH₃) ppm.

MS (ESI): m/z = 169 [M + H]⁺.

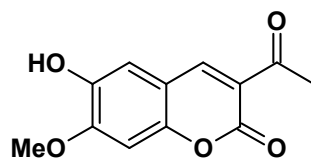
2,4-Dihydroxy-5-methoxybenzaldehyd (51)

In 200 mL trockenem Dichlormethan wurde 40 g Aluminiumchlorid suspendiert. 10 g (50 mmol) 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (**50**) wurde in 50 mL Dichlormethan gelöst und langsam zugetropft. Der Ansatz wurde 4 h unter Rückfl. erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wurde der Ansatz auf 250 g Eis gegeben. Nach Zugabe von 50 mL konz. Salzsäure wurden die Phasen getrennt. Die wässr. Phase wurde zweimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden zweimal mit je 120 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Nach Umkristallisation aus Toluol wurde ein beiger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6,24 g (37,1 mmol, 74 %), Lit. [102]: 92 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 11,32$ (s, 1H, OH), 9,67 (s, 1H, CHO), 6,89 (s, 1H, OH), 6,52 (s, 1H, H-6), 6,41 (s, 1H, H-3), 3,91 (s, 3H, OCH_3) ppm.

MS (ESI): $m/z = 169$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

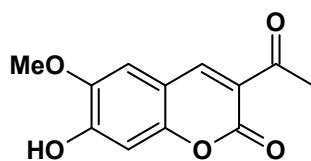
3-Acetyl-6-hydroxy-7-methoxycoumarin (42)

In 3 mL abs. Ethanol wurde 264 mg (1,57 mmol) 2,5-Dihydroxy-4-methoxybenzaldehyd (**49**) suspendiert. Unter Stickstoff-Atmosphäre wurde 200 μ L (204 mg, 1,57 mmol) Ethylacetoacetat und drei Tropfen Piperidin gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 1,5 h unter Rückfl. erhitzt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit etwas Ethanol gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1, $R_f = 0,38$) und ein gelber Feststoff wurde erhalten.

Ausbeute: 239 mg (1,02 mmol, 65%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9,65$ (s, 1H, OH), 8,61 (s, 1H, H-4), 7,27 (s, 1H, H-5), 7,15 (s, 1H, H-8), 3,97 (s, 3H, OCH₃), 2,61 (s, 3H, CH₃) ppm.

MS (ESI): $m/z = 235$ [M + H]⁺.

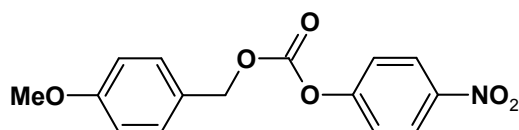
3-Acetyl-6-methoxy-7-hydroxycumarin (43)

In 60 mL abs. Ethanol wurde 3,00 g (17,8 mmol) 2,4-Dihydroxy-5-methoxybenzaldehyd (**51**) suspendiert. Unter Stickstoff-Atmosphäre wurde 2,30 mL (17,8 mmol) Ethylacetoacetat und drei Tropfen Piperidin gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 1,5 h unter Rückfl. erhitzt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit etwas Ethanol gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 786 mg (3,36 mmol, 19 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9,61$ (s, 1H, OH), 8,54 (s, 1H, H-4), 7,21 (s, 1H, H-5), 7,08 (s, 1H, H-8), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 2,66 (s, 3H, CH₃) ppm.

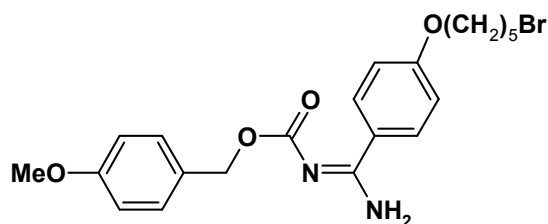
MS (ESI): $m/z = 235$ [M + H]⁺.

4-Methoxybenzyl-4-nitrophenylcarbonat (59)

In 100 mL Dichlormethan wurden 4,4 mL Pyridin und 4,5 mL (5,0 mL, 36,2 mmol) *p*-Anisilalkohol (**57**) gegeben und auf 0 °C gebracht. In 100 mL Dichlormethan wurde 7,3 g (36,2 mmol) *p*-Nitrophenylchloroformiat (**58**) gelöst und innerhalb von 45 min zum Reaktionsansatz getropft. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemp. gerührt. Die org. Phase wurde dreimal mit je 30 mL dest. Wasser und einmal mit 60 mL Brine gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1, $R_f = 0,5$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 9,58 g (31,59 mmol, 87 %), Lit[109]: 94 %.

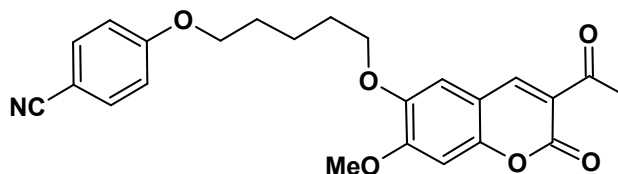
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,26$ (m_c, 2H, Ar-*H*), 7,37 (m_c, 4H, Ar-*H*), 6,93 (m_c, 2H, Ar-*H*), 5,24 (s, 2H, CH_2), 3,83 (s, 3H, OCH_3) ppm.

***N*-(4-Methoxybenzyloxycarbonyl)-4-amidino-1-(5-Brompentoxy)benzol
(60)**

In 20 mL *N,N*-Dimethylformamid und 2 mL Triethylamin wurde 1,50 g (5,26 mmol) 4-(1-Brompentoxy)-benzamidin (**45**) vorgelegt. 1,46 g (4,83 mmol) 4-Methoxybenzyl-4-nitrophenylcarbonat (**59**) wurde in 20 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und innerhalb von 20 min zum Ansatz getropft. Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde 16 h bei Raumtemp. gerührt. Der Ansatz wurde auf 60 mL dest. Wasser gegeben und danach mit eisgekühlter 10 % Zitronensäure auf pH 5 gebracht. Die wässr. Phase wurde dreimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurde einmal mit 60 mL 10 % Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 60 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde aufs Kieselgel aufgezogen und nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1, $R_f = 0,48$) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 855 mg (1,90 mmol, 36 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,84$ (m_c , 2H, Ar-*H*), 7,40 (m_c , 2H, Ar-*H*), 6,88 (m_c , 4H, Ar-*H*), 5,14 (s, 2H, CH_2), 4,00 (t, 2H, OCH_2), 3,79 (s, 3H, OCH_3), 3,56 (t, 2H, CH_2Br), 1,85, 1,64 ($2 \times m_c$, 6H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_3$) ppm.

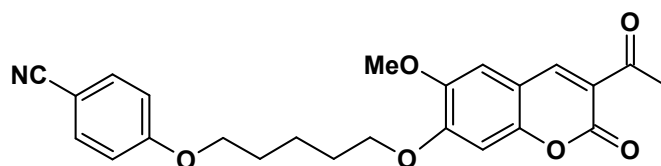
**7-(4-Cyanophenoxy)-pentoxy-6-methoxy-3-acetyl-2H-1benzopyran-2-one
(46)**

In 15 mL trockenem Aceton wurden 3,82 mg (1,63 mmol) 3-Acetyl-6-hydroxy-7-methoxycumarin (**42**), 436 mg (1,63 mmol) 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)pentan (**44**) gelöst und 338 mg (2,45 mmol) Kaliumcarbonat suspendiert. Zu der Suspension wurde eine katalytische Menge an Kaliumiodid gegeben. Die Suspension wurde 16 h unter Rückfl. erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde in 25 mL Chloroform aufgenommen. Die org. Phase wurde zweimal mit dest. Wasser und einmal mit ges. Natriumchlorid Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel gezogen und mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:1) säulenchromatographisch gereinigt. Es wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 87 mg (0,206 mmol, 13%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,62$ (s, 1H, $H-4$), 7,78 (m_c , 3H, $H-5$, Ar- H), 7,52 (s, 1H, $H-8$), 7,15 (m_c , 2H, Ar- H), 4,13 (t, 2H, OCH_2), 4,06 (t, 2H, CH_2Br), 3,94 (s, 3H, OCH_3), 2,60 (s, 3H, CH_3), 1,85 - 1,62 (m, 6H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_3$) ppm.

MS (ESI): $m/z = 422$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

**7-Methoxy-6-(4-cyanophenoxy)-pentoxy-3-acetyl-2H-1benzopyran-2-one
(47)**

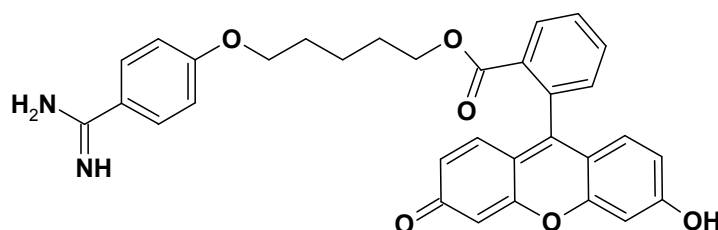
In 20 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid wurde 786 mg (3,36 mmol) 3-Acetyl-6-methoxy-7-hydroxycumarin (**43**), 918 mg (3,42 mmol) 1-Brom-5-(4-cyanophenoxy)-pentan (**44**) gelöst und 1,11 g (3,36 mmol) Cäsiumcarbonat suspendiert. Unter Argon-Atmosphäre wurde der Ansatz 16 h bei 80 °C erhitzt. 50 mL Chloroform wurde zugegeben und die org. Phase wurde einmal mit 50 mL dest. Wasser und einmal mit 50 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die org. Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgezogen und nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1) wurde ein gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 893 mg (2,12 mmol, 63 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8,56 (s, 1H, *H*-4), 7,74 (m_c , 3H, *H*-5, Ar-*H*), 7,48 (s, 1H, *H*-8), 7,13 (m_c , 2H, Ar-*H*), 4,14 (t, 2H, OCH_2), 4,02 (t, 2H, CH_2Br), 3,90 (s, 3H, OCH_3), 2,56 (s, 3H, CH_3), 1,81 - 1,57 (m, 6H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_3$) ppm.

MS (ESI): m/z = 422 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

1-[2-(6-Hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoyl]-4-(1-Brompentoxy)-benzamidin (**62**)

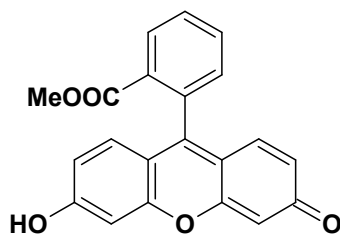


In 20 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid wurde 665 mg (2,00 mmol) Fluorescein (**38**), 570 mg (2,00 mmol) 4-(1-Brompentoxy)-benzamidin (**45**) und 622 mg (4,50 mmol) Kaliumcarbonat gelöst. Der Ansatz wurde 4 h bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde 40 mL dest. Wasser zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde abgenutscht und mehrmals mit dest. Wasser gewaschen. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Aceton:Methanol, 3:1) wurde ein oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 70 mg (0,13 mmol, 20 %).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 8,08 (d, 1H, *H*-2), 7,74 (m_c, 4H, Ar-*H*, *H*-4, *H*-5), 7,34 (d, 1H, *H*-5), 7,08 (d, 2H, Ar-*H*), 6,53 (s, 1H, *H*-12), 6,50 (s, 1H, *H*-15), 6,15 (dd, 2H, *H*-10, *H*-17), 6,04 (d, 2H, *H*-9, *H*-18), 3,90 (m, 4H, 2×OCH₂), 1,58 - 0,99 (m, 6H, (CH₂)₃) ppm.

MS (ESI): m/z = 537 [M + H]⁺.

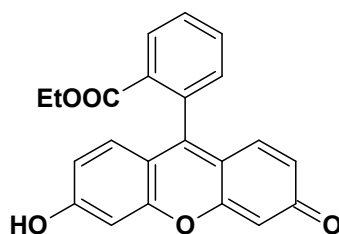
2-(6-Hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoesäuremethylester (64)

In 60 mL Methanol wurde 6,00 g (18,1 mmol) Fluorescein (**38**) suspendiert. Zu der Suspension wurde 3 mL Schwefelsäure gegeben und anschließend 16 h unter Rückfl. erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wurde 300 mL Ethylacetat dazugegeben. Die Mischung wurde zu 150 mL 5 % Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben und bei Raumtemp. gerührt bis keine Gasentwicklung zu beobachten ist. Die wässr. Phase wurde einmal mit 150 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden dreimal mit je 150 mL 5 % Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit 150 mL dest. Wasser gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol, 9:1) wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,79 g (5,17 mmol, 29 %), Lit.[114]: 87 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 8,31 (dd, 1H, J = 7,8, 1,5 Hz, $H-2$), 7,86 (ddd, 1H, J = 7,4, 1,5 Hz, $H-4$), 7,79 (ddd, 1H, J = 7,6, 1,5 Hz, $H-3$), 7,44 (dd, 1H, J = 7,5, 1,5 Hz, $H-5$), 7,01 (d, 2H, J = 9,3 Hz, $H-9$, $H-18$), 6,76 (s, 2H, $H-12$, $H-15$), 6,70 (dd, 2H, J = 9,2, 2,3 Hz, $H-10$, $H-17$), 3,63 (s, 3H, CH_3) ppm.

MS (ESI): m/z = 347 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

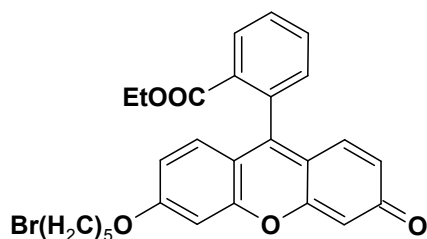
2-(6-Hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoesäureethylester (66)

In Ethanol wurde 1,0 g (3,0 mmol) Fluorescein (**38**) suspendiert. Zu der Suspension wurde 0,8 mL (15 mmol) konz. Schwefelsäure langsam zugetropft und anschließend 24 h unter Rückfl. erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und es wurde soviel Natriumhydrogencarbonat hinzugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Ethylacetat, dann Methanol/DCM, 1:9) wurde ein oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 810 mg (2,34 mmol, 75 %), Lit.[111]: 75 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 8,17$ (d, 1H, *H*-2), 7,85 (t, 1H, *H*-4), 7,76 (t, 1H, *H*-3), 7,49 (d, 1H, *H*-5), 6,80 (d, 2H, *H*-9, *H*-18), 6,78 (m, 4H, *H*-12, *H*-15, *H*-10, *H*-17), 3,96 (q, 2H, *CH*₂), 0,85 (t, 3H, *CH*₃) ppm.

MS (ESI): $m/z = 361$ [M + H]⁺.

2-[6-(5-Brompentoxy)-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl]benzoesäureethylester (67)

In 250 mL Acetonitril/*N,N*-Dimethylformamid wurde 1,5 g (4,2 mmol) 2-(6-Hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoesäureethylester (**66**), 1,2 g (8,3 mmol) Kaliumcarbonat und 1,9 g (8,3 mmol) 1,5-Dibrompentan (**52**) gelöst und bei 70 °C 4 h lang erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz filtriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatografischer Reinigung an Kieselgel (Ethylacetat/Dichlormethan/Ethanol, 1:1:12) wurde ein oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 767 mg (1,51 mmol, 36 %).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 8,19 (d, 1H, *H*-2), 7,86 (t, 1H, *H*-4), 7,78 (t, 1H, *H*-3), 7,49 (d, 1H, *H*-5), 7,22 (d, 2H, *CH*), 6,85 (m, 3H, 3×*CH*), 6,39 (dd, 1H, *CH*), 6,24 (d, 1H, *CH*), 4,15 (t, 2H, OCH₂), 3,96 (q, 2H, CH₂), 3,55 (t, 2H, CH₂Br), 1,93 - 1,73 (m, 6H, (CH₂)₃) 0,87 (t, 3H, CH₃) ppm.

MS (ESI): m/z = 510 [M + H]⁺.

Literaturverzeichnis

- [1] V. W. Cornish, D. Mendel, and P. G. Schultz. Probing Protein Structure and Function with an Expanded Genetic Code. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 34:621 – 633, 1995.
- [2] J. Drews. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science*, 287:1960 – 1964, 2000.
- [3] M. J. Zoller and M. Smith. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 10:6487 – 6500, 1982.
- [4] J. R. Knowles. Tinkering with Enzymes: What Are We Learning? *Science*, 236:1252 – 1258, 1987.
- [5] D. L. Beene, D. A. Dougherty, and H. A. Lester. Unnatural amino acid mutagenesis in mapping ion channel function. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13:264 – 270, 2003.
- [6] P. M. England. Unnatural Amino Acid Mutagenesis: A Precise Tool for Probing Protein Structure and Function. *Biochemistry*, 43:11623 – 11629, 2004.
- [7] J. Xie and P. G. Schultz. A chemical toolkit for proteins: an expanded genetic code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7:775 – 782, 2006.
- [8] J. Graw. *Genetik*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2006.
- [9] T. D. Pollard and W. C. Earnshaw. *Cell Biology*. SAUNDERS Elsevier, Philadelphia, 2 edition, 2008.

- [10] J. D. Robertus, J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes, R. S. Brown, B. F. C. Clark, and A. Klug. Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature*, 250:546 – 551, 1974.
- [11] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. Wang, and N. C. Seeman. Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science*, 185:435 – 440, 1974.
- [12] F. Chapeville, F. Lipman, G. Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray, and S. Benzer. On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 48:1086 – 1092, 1962.
- [13] S. Riyasaty and J. F. Atkins. External suppression of a frameshift mutant in *Salmonella*. *J. Mol. Biol.*, 34:541 – 557, 1968.
- [14] T. J. Magliery, J. C. Anderson, and P. G. Schultz. Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 307:755 – 769, 2001.
- [15] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Muramaki, and M. Sisido. Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Streptavidin through *In Vitro* Frame-Shift Suppression. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:9778–9779, 1996.
- [16] M. Sisido and T. Hohsaka. Extension of Protein Functions by the Incorporation of Nonnatural Amino Acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 72:1409 – 1425, 1999.
- [17] A. K. Kowal and J. S. Oliver. Exploiting unassigned codons in *Micrococcus luteus* for tRNA-based amino acid mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, 25:4685 – 4689, 1997.
- [18] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, D. J. Suich, K. A. Noren, M. C. Griffith, and P. G. Schultz. In vitro suppression of an amber mutation by a chemically aminoacylated transfer RNA prepared by runoff transcription. *Nucleic Acids Res.*, 18:83 – 88, 1989.

- [19] J. D. Bain, E. S. Diala, C. G. Glabe, T. A. Dix, and A. R. Chamberlin. Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8013 – 8014, 1989.
- [20] J. D. Bain, C. Switzer, R. Chamberlin, and S. A. Bennert. Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code. *Nature*, 356:537 – 539, 1992.
- [21] G. Eggertsson and D. Söll. Transfer Ribonucleic Acid-Mediated Suppression of Termination Codons in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 52:354 – 374, 1988.
- [22] S. T. Cload, D. R. Liu, W. A. Froland, and P. G. Schultz. Development of improved tRNAs for *in vitro* biosynthesis of proteins containing unnatural amino acids. *Chem. Biol.*, 3:1033 – 1038, 1996.
- [23] J. C. Anderson and P. G. Schultz. Adaption of an Orthogonal Archaeal Leucyl-tRNA and Synthetase Pair for Four-base, Amber and Opal Suppression. *Biochemistry*, 42:9598 – 9608, 2003.
- [24] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, and O. C. Uhlenbeck. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.*, 15:8783 – 8798, 1987.
- [25] N. Budisa. Prolegomena zum experimentellen Engineering des genetischen Codes durch Erweiterung seines Aminosäurerepertoires. *Angew. Chem.*, 116:6586 – 6624, 2004.
- [26] M. H. Caruthers. Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and Its Uses. *Science*, 230:281 – 285, 1985.
- [27] M. D. Matteucci and M. H. Caruthers. Synthesis of Deoxyoligonucleotides on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185 – 3191, 1981.
- [28] T. G. Heckler, Y. Zama, T. Naka, and S. M. Hecht. Dipeptide Formation with Misacylated tRNA Phe. *J. Biol. Chem.*, 258:4492 – 4495, 1983.
- [29] T. G. Heckler, L. H. Chang, Y. Zama, T. Naka, and S. M. Hecht. Preparation

- of 2'(3')-O-Acyl-pCpA: Derivatives as Substrates for T4 RNA Ligase-mediated "chemical aminoacylation". *Tetrahedron*, 40:87 – 94, 1984.
- [30] S. A. Robertson, C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, and P. G. Schultz. The use of 5'-phospho-2 deoxyribocytidylylriboadenosine as a facile route to chemical aminoacylation of tRNA. *Nucleic Acids Res.*, 17:9649 – 9660, 1989.
- [31] M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty, and H. A. Lester. Nicotinic receptor binding site probed with unnatural amino acid incorporation in intact cells. *Science*, 268:439 – 442, 1995.
- [32] H. Borsook. Protein turnover and incorporation of labeled amino acids into tissue proteins *in vivo* and *in vitro*. *Physiol. Rev.*, 30:206 – 219, 1950.
- [33] E. F. Gale and J. P. Folkes. Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino-acid incorporation in disrupted staphylococcal cells. *Nature*, 173:1223 – 1227, 1954.
- [34] A. S. Spirin. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol.*, 22:538 – 545, 2004.
- [35] F. Katzen, G. Chang, and W. Kudlicki. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.*, 23:150 – 156, 2005.
- [36] Y. Shimizu, Y. Kuruma, B.-W. Ying, S. Umekage, and T. Ueda. Cell-free translation systems for protein engineering. *FEBS J.*, 273:4133 – 4140, 2006.
- [37] C. Klammt, F. Löhr, B. Schäfer, W. Haase, V. Dötsch, H. Rüterjans C. Glau-bitz, and F. Bernhard. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, 271:568 – 580, 2004.
- [38] L. Guignard, K. Ozawa, S. E. Pursglove, G. Otting, and N. E. Dixon. NMR analysis of *in vitro*-synthesized proteins without purifications: a high-throughput approach. *FEBS Lett.*, 524:159 – 162, 2002.

- [39] S. Sobhanifar, S. Reckel, F. Junge, D. Schwarz, Lei Kai, M. Karbyshev, F. Löhr, F. Bernhard, and V. Dötsch. Cell-free expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins. *J. Biomol. NMR*, 46:33 – 43, 2010.
- [40] E. H. Morita, T. Sawasaki, R. Tanaka, Y. Endo, and T. Kohno. A wheat germ cell-free system is a novel way to screen protein folding and function. *Protein Sci.*, 12:1216 – 1221, 2003.
- [41] F. Junge, S. Haberstock, C. Roos, S. Stefer, D. Proverbio, V. Dötsch, and F. Bernhard. Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *N. Biotechnol.*, 28:262 – 271, 2011.
- [42] D. Schwarz, C. Klammt, A. Koglin, F. Löhr, B. Schneider, V. Dötsch, and F. Bernhard. Preparative cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*, 41:355 – 369, 2007.
- [43] D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Fröhlich, B. Schneider, S. Recker, S. Sobhanifar, V. Dötsch, and F. Bernhard. Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.*, 2:2945 – 2957, 2007.
- [44] L. Kai, R. Kaldenhoff, J. Lian, X. Zhu, V. Dötsch, F. Bernhard, P. Cen, and Z. Xu. Preparative scale production of functional mouse aquaporin 4 using different cell-free expression modes. *PLoS ONE*, 5:e12972, 2010.
- [45] A. Helenius and K. Simons. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 415:29 – 79, 1975.
- [46] A. Müller-Lucks, S. Bock, B. Wu, and E. Beitz. Fluorescent *In Situ* Folding Control for Rapid Optimization of Cell-Free Membrane Protein Synthesis. *PLoS ONE*, 7:e42186 – e42186, 2012.
- [47] E. N. Lyukmanova, Z. O. Shenkarev, N. F. Khabibullina, G. S. Kopeina, M. A. Shulepko, A. S. Paramonov, K. S. Mineev, R. V. Tikhonov, L. N. Shingarova, L. E. Petrovskaya, D. A. Dolgikh, A. S. Arseniev, and M. P. Kirpichnikov.

- Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: Comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818:349 – 358, 2012.
- [48] J. R. Brotherus, P. C. Jost, O. H. Griffith, and L. E. Hokin. Detergent Inactivation of Sodium- and Potassium-Activated Adenosinetriphosphate of the Electric Eel. *Biochemistry*, 18:5043 – 5050, 1979.
- [49] C. Breyton, C. Tribet, J. Olive, J.-P. Dubacq, and J.-L. Popot. Dimer to Monomer Conversion of the Cytochrome b_6f Complex. *J. Biol. Chem.*, 272:21892 – 21900, 1997.
- [50] J.-L. Popot. Amphipols, Nanodiscs, and Fluorinated Surfactants: Three Non-conventional Approaches to Studying Membrane Proteins in Aqueous Solutions. *Annu. Rev. Biochem.*, 79:737 – 775, 2010.
- [51] J. U. Bowie. Stabilizing membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11:397 – 402, 2001.
- [52] R. M. Garavito and S. Ferguson-Miller. Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *J. Biol. Chem.*, 276:32403 – 32406, 2001.
- [53] Y. Gohon and J.-L. Popot. Membrane protein-surfactant complex. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 8:15 – 22, 2003.
- [54] K. A. Dill and J. L. MacCallum. The Protein-Folding Problem, 50 Years on. *Science*, 338:1042 – 1046, 2012.
- [55] J.-L. Popot, T. Althoff, D. Bagnard, J.-L. Banères, P. Bazzacco, E. Billon-Denis, L. J. Catoire, P. Champeil, D. Charvolin, M. J. Cocco, G. Crémel, T. Dahmane, L. M. de la Maza, C. Ebel, F. Gabel, F. Giusti, Y. Gohon, E. Goormaghtigh, E. Guittet, J. H. Kleinschmidt, W. Kühlbrandt, C. Le Bon, K. L. Martinez, M. Picard, B. Pucci, J. N. Sachs, C. Tribet, C. van Heijenoort, F. Wien, F. Zito, and M. Zoonens. Amphipols from A to Z. *Annu. Rev. Biophys.*, 40:379 – 408, 2011.
- [56] P. Champeil, T. Menguy, C. Tribet, J.-L. Popot, and M. le Maire. Interaction

- of Amphipols with Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.*, 275:18623 – 18637, 2000.
- [57] M. Picard, C. Duval-Terrié, E. Dé, and P. Champeil. Stabilization of membranes upon interaction of amphipathic polymers with membrane proteins. *Protein Science*, 13:3056 – 3058, 2004.
- [58] M. Zoonens, F. Giusti, F. Zito, and J.-L. Popot. Dynamic of Membrane Protein/Amphipol Association Studied by Förster Resonance Energy Transfer: Implications for in Vitro Studies of Amphipol-Stabilized Membrane Proteins. *Biochemistry*, 46:10392 – 10404, 2007.
- [59] Y. Gohon, T. Dahmane, R. W. H. Ruigrok, P. Schuck, D. Charvolin, F. Rappaport, P. Timmins, D. M. Engelman, C. T, J.-L. Popot, and C. Ebel. Bacteriorhodopsin/Amphipol Complexes: Structural and Functional Properties. *Biophys. J.*, 94:3523 – 3537, 2008.
- [60] J. Keiser, A. Stich, and C. Burri. New drugs for the treatment of human African trypanosomiasis: research and development. *Trends Parasitol.*, 17:42 – 49, 2001.
- [61] P. G. E. Kennedy. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J. Clin. Invest.*, 113:496 – 504, 2004.
- [62] A. Stich and D. Steverding. Trypanosomen: Die Rückkehr einer Seuche. *Biol. Unserer Zeit*, 5:294 – 302, 2002.
- [63] D. Steverding. The history of African trypanosomiasis. *Parasit. Vectors*, 1:1 – 8, 2008.
- [64] A. H. Fairlamb. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends Parasitol.*, 19:488 – 494, 2003.
- [65] M. C. Field and M. Carrington. The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7:775 – 786, 2009.
- [66] I. M. Rollo and J. Williamson. Acquired resistance to 'Melarsen', trypanosomi-

- de and amidines in pathogenic trypanosomes after treatment with 'Melarsen' alone. *Nature*, 167:147 – 148, 1951.
- [67] N. S. Carter and A. H. Fairlamb. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature*, 361:173 – 175, 1993.
- [68] N. S. Carter, B. J. Berger, and A. H. Fairlamb. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Biol. Chem.*, 270:28153 – 28157, 1995.
- [69] P. Mäser, C. Sütterlin, A. Kralli, and R. Kaminsky. A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. *Science*, 285:242 – 244, 1999.
- [70] E. Matovu, M. L. Stewart, F. Geiser, R. Brun, P. Mäser, L. J. M. Wallace, R. J. Burchmore, J. C. K. Enyaru, M. P. Barrett, R. Kaminsky, T. Seebeck, and H. P. de Koning. Mechanism of Arsenical and Diamidine Uptake and Resistance in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 2:1003 – 1008, 2003.
- [71] S. Alsford, S. Eckert, N. Baker, L. Glover, A. Sanchez-Flores, K. F. Leung, D. J. Turner, M. C. Field, M. Berriman, and D. Horn. High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature*, 482:232 – 237, 2012.
- [72] K. B. Heller, E. C. Lin, and T. H. Wilson. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 144:274 – 278, 1980.
- [73] M. J. Borgnia and P. Agre. Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:2888 – 2893, 2001.
- [74] B. L. Smith and P. Agre. Erythrocyte mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J. Biol. Chem.*, 266:6407 – 6415, 1991.
- [75] T. Walz, B. L. Smith, P. Agre, and A. Engel. The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP. *EMBO J.*, 13:2985 – 2993, 1994.

- [76] D. Wree, B. Wu, T. Zeuthen, and E. Beitz. Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS J.*, 278:740 – 748, 2011.
- [77] H. Li, H. Chen, C. Steinbronn, B. Wu, E. Beitz, T. Zeuthen, and G. A. Voth. Enhancement of proton conductance by mutations of the selectivity filter of aquaporin-1. *J. Mol. Biol.*, 407:607 – 620, 2011.
- [78] B. Wu and E. Beitz. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64:2413–2421, 2007.
- [79] R. M. Stroud, P. Nollert, and L. Miercke. The glycerol facilitator GlpF its aquaporin family of channels, and their selectivity. *Adv. Protein Chem.*, 63:291 – 316, 2003.
- [80] E. Beitz and J. E. Schultz. Aquaporine - zelluläre Wasserkanäle als therapeutisches Target? *Pharm. Unserer Zeit*, 28:67 – 73, 1999.
- [81] N. L. Uzcategui, A. Szallies, S. Pavlovic-Djuranovic, M. Palmada, K. Figarella, C. Boehmer, F. Lang, E. Beitz, and M. Duszenko. Cloning, Heterologous Expression, and Characterization of Three Aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, 279:42669 – 42676, 2004.
- [82] T. Zeuthen, B. Wu, S. Pavlovic-Djuranovic, L. M. Holm, N. L. Uzcategui, M. Duszenko, J. F. J. Kun, J. E. Schultz, and E. Beitz. Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.*, 61:1598 – 1608, 2006.
- [83] B. Bassarak, N. L. Uzcategui, C. Schönfeld, and M. Duszenko. Functional Characterization of Three Aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei* in Osmoregulation and Glycerol Transport. *Cell. Physiol. Biochem.*, 27:411 – 420, 2011.
- [84] N. Baker, L. Glover, J. C. Munday, D. Aguinaga Andrés, M. P. Barrett, H. P. de Koning, and D. Horn. Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in african trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109:10996 – 11001, 2012.

- [85] T. Wistuba. *Entwicklung einer Synthesestrategie aminoacylierter Dimerfragmente der tRNA mittels Festphasensynthese*. PhD thesis, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2004.
- [86] M. Chemama, M. Fonvielle, M. Arthur, J.-M. Valery, and M. Etheve-Quellejeu. Synthesis of stable aminoacyl-tRNA analogues containing triazole as a bioisoster of esters. *Chem. Eur. J.*, 15:1929 – 1938, 2009.
- [87] L. Wang, J. Xie, A. A. Deniz, and P. G. Schultz. Unnatural amino acid mutagenesis of green fluorescent protein. *J. Org. Chem.*, 68:174–176, 2003.
- [88] M. Lodder, B. Wang, and S. H. Hecht. The *n*-pentenoyl protecting group for aminoacyl-tRNAs. *Methods*, 36:245 – 251, 2005.
- [89] J. R. Sampson and O. C. Uhlenbeck. Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:1033 – 1037, 1988.
- [90] M. E. Saks, J. R. Sampson, M. W. Nowak, P. C. Kearney, F. Du, J. N. Abelson, H. A. Lester, and D. A. Dougherty. An engineered *Tetrahymena* tRNA^{Gln} for *in vivo* incorporation of unnatural amino acids into proteins by nonsense suppression. *J. Biol. Chem.*, 271:23169 – 23175, 1996.
- [91] K. Park, E. Billon-Denis, T. Dahmane, F. Lebaupain, B. Pucci, C. Breyton, and F. Zito. In the cauldron of cell-free synthesis membrane proteins: playing with new surfactans. *N. Biotechnol.*, 28:255 – 261, 2011.
- [92] C. Klammt, M. H. Perrin, I. Maslennikov, L. Renault, M. Krupa, W. Kwiatkowski, H. Stahlberg, W. Vale, and S. Choe. Polymer-based cell-free expression of ligand-binding family B G-protein coupled receptors without detergents. *Protein Sci.*, 20:1030 – 1041, 2011.
- [93] P. Bazzacco, E. Billon-Denis, K. Shivaji Sharma, L. J. Catoire, S. Mary, C. Le Bon, E. Point, J.-L. Banères, G. Durand, F. Zito, B. Pucci, and J. Popot. Nonionic Homopolymeric Amphipols: Application to Membrane Protein Folding, Cell-Free Synthesis, and Solution Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry*, 51:1416 – 1430, 2012.

- [94] E. R. Geertsma, M. Groeneveld, D. J. Slotboom, and B. Poolman. Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105:5722 – 5727, 2008.
- [95] S. Bock. *Zellfreie Synthese von schwer herstellbaren Proteinen*. PhD thesis, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, 2014.
- [96] B. D. Judkins, D. G. Allen, T. A. Cook, B. Evans, and T. E. Sardharwala. A Versatile Synthesis of Amidines from Nitriles Via Amidoxims. *Synth. Commun.*, 26:4351 – 4367, 1996.
- [97] K. Nadrah and M. Sollner Dolenc. Preparation of Amidines by Amidoxime Reduction with Potassium Formate. *Synlett*, 8:1257 – 1258, 2007.
- [98] R. S. Garigipati. An efficient conversion of nitriles to amidines. *Tetrahedron Lett.*, 31:1969 – 1972, 1990.
- [99] L. D. Lavis and R. T. Raines. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.*, 3:142 – 155, 2008.
- [100] A. Takadate, T. Masuda, C. Murata, M. Shibuya, and A. Isobe. Structural Features for Fluorescing Present in Methoxycoumarins. *Chem. Pharm. Bull.*, 48:256 – 260, 2000.
- [101] S. Wang, J. Yan, X. Wang, Z. Yang, F. Lin, and T. Zhang. Synthesis and evaluation of the α -glucosidase inhibitory activity of 3-[4-(phenylsulfoamido)benzoyl]-2H-1-benzopyran-2-one derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 45:1250 – 1255, 2010.
- [102] X. Cai, J. Yang, J. Zhou, W. Lu, C. Hu, Z. Gu, J. Huo, X. Wang, and P. Cao. Synthesis and biological evaluation of scopoletin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 21:84 – 92, 2013.
- [103] Y. Hadari and L. M. Smith. EGFR tyrosine kinase inhibitors. *WO2005/009384 A2*, 2004.
- [104] P. J. Blower, C. M. Smith, R. J. Smith, G. E. Moores, and M. J. O’Doherty.

- Preparation and stability of a radioiodinated pentamidine isethionate analog. *Appl. Radiat. Isot.*, 43:1189 – 1195, 1992.
- [105] J. I. Levin, E. Turos, and S. M. Weinreb. An alternative procedure for the aluminium-mediated conversion of esters to amides. *Synth. Commun.*, 12:989 – 993, 1982.
- [106] U. E. Lange, B. Schäfer, D. Baucke, E. Buschmann, and H. Mack. A New Mild Method for the Synthesis of Amidines. *Tetrahedron Lett.*, 40:7067 – 7071, 1999.
- [107] R. J. Chalifour, X. Kong, X. Wu, and W. Lu. Amidine Derivatives For Treating Amyloidosis. *WO/2003/017994*, 2003.
- [108] K. Jarowicki and P. Kocienski. Protecting groups. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, pages 2495 – 2527, 2000.
- [109] C. Bailey, E. Baker, J. Hayler, and P. Kane. Amidine protection for solution phase library synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 40:4847 – 4850, 1999.
- [110] S. A. P. Guarin, D. Tsang, and W. G. Skene. Spectroscopic studies of a fluorescent fluoresceinophane formed *via* a practical synthetic route. *New J. Chem.*, 31:210 – 217, 2007.
- [111] J. Wrzesien and D. Graham. Synthesis of SERS active nanoparticles for detection of biomolecules. *Tetrahedron*, 68:1230 – 1240, 2012.
- [112] A. V. Rukavishnikov, M. P. Smith, G. C. Birell, J. F. W. Keana, and O. H. Griffith. Synthesis of a New Fluorogenic Substrate for the Assay of Phosphoinositide-Specific Phospholipidase C. *Tetrahedron Lett.*, 39:6637 – 6640, 1998.
- [113] X. Li, R. Higashikubo, and J.-S. Taylor. Use of Multiple Carboxylates to Increase Intracellular Retention of Fluorescent Probes Following Release From Cell Penetrating Fluorogenic Conjugates. *Bioconjugate Chem.*, 19:50 – 56, 2008.
- [114] S. Chen, X. Zhao, J. Chen, J. Chen, L. Kuznetsova, S. S. Wong, and I. Ojima. Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of

- Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release. *Bioconjugate Chem.*, 21:979 – 987, 2010.
- [115] X.-L. Du, H. S. Zhang, X.-F. Guo, Y.-H. Deng, and H. Wang. 6-Oxy-(acetyl piperazine) fluoescin as a new fluorescent labeling reagent for free fatty acids in serum using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1169:77 – 85, 2007.
- [116] C. D. Spicer, T. Triemer, and B. G. Davis. Palladium-mediated Cell-Surface Labeling. *J. Am. Chem. Soc.*, 134:800 – 803, 2011.
- [117] X.-F. Zhu and A. I. Scott. An Improves Synthesis of the Dinucleotides pdCpA and pdCpdA. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 20:197 – 211, 2001.
- [118] C. Dueymes, A. Schönberger, I. Adamo, A.-E. Navarro, A. Meyer, M. Lange, J.-L. Imbach, F. Link, F. Morvan, and J.-J. Vasseur. High-Yield Solution-Phase Synthesis of Di- and Trinucleotide Blocks Assisted by Polymer-Supported Reagents. *Org. Lett.*, 7:3485 – 3488, 2005.
- [119] A. Mueller. *Studien zur Synthese einer tRNA durch chemische Ligation von RNA-Strängen*. PhD thesis, Albert-Ludwigs-Universitaet Freiburg, 2005.
- [120] M. Taiji, S. Yokohama, and T. Miyazawa. Transacylation Rates of (Aminoacyl)adenosine Moiety at the 3'-Terminus of Aminoacyl Transfer Ribonucleic Acid. *Biochemistry*, 22:3220–3225, 1983.
- [121] R. C. Nangreave, L. M. Dedkova, S. Chen, and S. M. Hecht. A New Strategy for the Synthesis of Bisaminoacylated tRNAs. *Org. Lett.*, 13:4906 – 4909, 2011.
- [122] M. Duca, D. J. Maloney, M. Lodder, B. Wang, and S. M. Hecht. Synthesis of bisaminoacylated pdCpAs and tandemly avtivated transfer RNAs. *Bioorg. Med. Chem.*, 15:4629 – 4642, 2007.
- [123] B. Wang, J. Zhou, M. Lodder, R. D. Anderson III, and S. M. Hecht. Tandemly activated tRNAs as participants in protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 281:13865 – 13868, 2006.
- [124] D. Kajihara, T. Hohsaka, and M. Sisido. Synthesis and sequence optimization

- of GFP mutants containing aromatic non-natural amino acids at the Tyr66 position. *Protein Eng., Des. Sel.*, 18:273 – 278, 2005.
- [125] C. Klammt, D. Schwarz, K. Fendler, W. Haase, V. Dötsch, and F. Bernhard. Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J.*, 23:6024 – 6038, 2005.
- [126] T. Dahmane, M. Damian, S. Mary, J.-L. Popot, and J.-L. Banéres. Amphipol-assisted in vitro folding of G protein-coupled receptors. *Biochemistry*, 48:6516 – 6521, 2009.
- [127] C. L. Pocanschi, T. Dahmane, Y. Gohon, F. Rappaport, H.-J. Apell, J. H. Kleinschmidt, and J.-L. Popot. Amphipathic Polymers: Tools To Fold Integral Membrane Proteins to Their Active Forms. *Biochemistry*, 45:13954 – 13961, 2006.
- [128] J.-L. Rigaud, D. Levy, and G. Mosser. Detergent removal by non-polar polystyrene beads. *Eur. Biophys. J.*, 27:305 – 319, 1998.
- [129] J. R. Schnell and J. J. Chou. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. *Nature*, 451:591 – 595, 2008.
- [130] G. M. Castanedo, P. S. Seng, N. Blaquiere, S. Trapp, and S. T. Staben. Rapid Synthesis of 1,3,5-Substituted 1,2,4-triazoles from Carboxylic Acids, Amidines, and Hydrazines. *J. Org. Chem.*, 76:1177 – 1179, 2011.
- [131] B. Schneider, F. Junge, V. A. Shirokov, F. Durst, D. Schwarz, V. Dötsch, and F. Bernhard. Membrane protein expression in cell-free system. *Methods Mol. Biol.*, 601:165 – 186, 2010.
- [132] L. Verdoucq, A. Grondin, and C. Maurel. Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2; gating by divalent cations and protons. *Biochem. J.*, 415:409 – 416, 2008.
- [133] E. R. Geertsma, N. A. Nik Mahmood, G. K. Schuurman-Wolters, and B. Pool-

- man. Membrane reconstitution of abc transporters and assays of translocator function. *Nat. Protoc.*, 3:256 – 266, 2008.
- [134] K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka, and Y. Fujiyoshi. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 1768:688 – 693, 2007.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die Abhandlung, abgesehen von der Betrachtung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Die Arbeit ist entstanden unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Kiel, Februar 2014

Ellen Mak

Lebenslauf

Ellen Mak

geboren am 21. März 1983

Geburtsort: Hamburg

Nationalität: Deutsch

Schule und Studium

- 06/2003 Abitur an der Lornsenschule in Schleswig
- 10/2003 Beginn des Chemiestudiums
Christian-Albrechts Universität zu Kiel
- 06/2009-03/2010 Anfertigung der Diplomarbeit
am Otto-Diels-Institut für Organische Chemie,
Christian-Albrechts Universität zu Kiel
Titel:
*27-39 gliedrige Pyridin-Makrocyclen zur Darstellung von
Rotaxanen über einen slipping-Prozess;*
Betreuer: Prof. Dr. Ulrich Lüning
- 03/2010 Diplomchemikerin

Promotion

- seit 2010 Doktorandin am Pharmazeutischen Institut,
Abt. Pharmazeutische und Medizinische Chemie
Christian-Albrechts Universität zu Kiel
Titel:
*Chemische und biochemische Synthesen zur
Funktionsuntersuchung von Membranproteinen;*
Betreuer: Prof. Dr. Eric Beitz
- Lehrtätigkeit im Studiengang Pharmazie,
4. Fachsemester: Instrumentelle Analytik

- Publikation** U. Lüning, **E. Mak**, M. Zindler, B. Hartkopf, R. Herges, 27- to 39-Membered Pyridine Macrocycles. *Eur. J. Org. Chem.*, 25:4932 - 4940, 2010.
- J. Song, **E. Mak**, B. Wu, E. Beitz, Parasite aquaporins: current developments in drug facilitation and resistance, *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, 2013, *in press*.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz. Ich möchte ihm herzlich für die Bereitstellung des interessanten und spannenden Themas danken. Ebenso danke ich ihm für die sehr gute Betreuung und die spannenden Diskussionen während der gesamten Zeit.

Meinem Arbeitskreis möchte ich für das stets freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit danken. Ein besonderer Dank geht an Julia vB und Sinja nicht nur für das Korrekturlesen meiner Arbeit, sondern auch für die Diskussionen im Labor, die Unterstützung bei den molekularbiologischen Fragen und vor allem die lustige Zeit nach dem Labor. Ein weiteres Dankeschön geht an Janis und Melanie ebenfalls für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Danke an Julia Hb und Tineke für die ermunternden Worte. Danke an Jie und Binghua für die Messungen meiner hergestellten Substanzen an der *Stopped flow* Apparatur.

Vielen Dank Björn für die Unterstützung bei den Synthesen und die gute Zusammenarbeit im Labor und im 4. Semester. Mein Dank geht auch an Dina für ihre Hilfe bei der Sequenzierung. Susan danke ich für die Einführung in die HPLC sowie die Erstellung der Betriebsanweisungen von den Chemikalien.

Bei allen Institutsangehörigen bedanke ich mich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und das Messen zahlreicher Spektren. Lukas danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Pinner Reaktion. Heyka, vielen Dank für die Überraschungsmuffins und die aufmunternden Worte.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung. Danke an meine lieben Schwestern Steffi und Jenni und meine Freunde, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Vielen Dank!