

Ein funktionelles Biomimetikum für die Nickel-Superoxiddismutase

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemischen-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität
von Dipl.-Biochem. Matthias Schmidt
geboren am 08. Juni 1978 in Bad Langensalza

Gutachter:

1 PD Dr. J. Weston

2 Prof. Dr. D. Walter

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. Juni 2007

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. J. Weston für die interessante Aufgabenstellung und die anhaltende Unterstützung.

Für die Kooperation möchte ich Prof. Dr. E. Kothe danken.

Dr. D. Imhof danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes für biochemische Arbeiten.

Dr. M. Görlach, Dr. O. Ohlenschläger und Michela Carella möchte ich für die Kooperation zur 3D-Strukturaufklärung danken.

Prof. Dr. D. Walter danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

DC S. Zahn danke ich für die Zusammenarbeit bei der Anfertigung der DFT-Rechnungen.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. W. Günther, Dr. W. Poppitz, Dr. Scheibner und Dr. M. Friedrich.

Der FSU Jena und der DFG (SFB 436) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Lebenslauf	VII
Selbstständigkeitserklärung	IX
1 Einleitung	1
2 Synthese	9
3 Charakterisierung	13
4 Komplexierung	19
4.1 Massenspektroskopie	19
4.2 Nickeltitration	23
4.3 NMR-Spektren des Nickel-Nonapeptidkomplexes	24
4.4 Zirkulardichroismus	26
5 Aktivitätsmessungen	29
5.1 Nachweis einer SOD-Aktivität	29
5.2 Untersuchung der SOD-Aktivität	30
5.3 McCord/Fridovich-Test	31
5.4 Quantifizierung der SOD-Aktivität	34
6 3D-Struktur in Lösung	39
6.1 2D-[¹ H, ¹ H]-ROESY-Spektren	39
6.2 2D-Konformationsvielfalt des Nonapeptidpeptids	43
6.3 Verfeinerung der 3D-Struktur in Lösung	48
6.4 Intramolekulare Stabilisierung der Ringkonformation	53
6.5 Erste Untersuchungen zum Spin-Zustand des Nickels	56
7 Mechanistische Untersuchungen	61
7.1 Modifizierung des Biomimetikums	61
7.1.1 Rolle des Histidins	61
7.1.2 Rolle des Prolins	64
7.1.3 Rolle des Tyrosins	65

7.2	Hexapeptid	66
7.2.1	Rolle der N-terminalen Aminogruppe	66
7.2.2	Rolle der Seitenketten	67
7.3	Metallaustausch	69
8	Zusammenfassung	71
9	Experimenteller Teil	73
9.1	Material und Methoden	73
9.2	Festphasenpeptidsynthesen	77
9.2.1	Synthese des Nonapeptids	77
9.2.2	Synthese der Nonapeptidmutanten His1Ala und Tyr9Ala	81
9.2.3	Synthese der Hexapeptide	81
9.2.4	Benzoylierung der N-terminalen Aminogruppe von His1	82
9.3	Bestimmung der SOD-Aktivität	83
9.3.1	Qualitativer Aktivitätstest	83
9.3.2	McCord/Fridovich-Test	84
9.4	Nickeltitration	85
9.5	Quantenchemische Berechnungen	85
	Anhang	89
	Abkürzungsverzeichnis	97
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	99
	Literaturverzeichnis	105

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlicher Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, 25. April 2007

1 Einleitung

Im Zuge der natürlichen Energiegewinnung in Mitochondrien werden organische Energieträger (z.B. Glukose) durch Sauerstoff in Kohlendioxid und Wasser umgesetzt.¹ Bei diesem Vorgang entstehen etwa 1 bis 5% reaktive Sauerstoffverbindungen als unvermeidliche Nebenprodukte (oxidativer Stress).^{2,3} Diese sind hauptsächlich Superoxidradikal-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxid-Radikale ($\cdot OH$). Diese reaktiven Intermediate greifen verschiedene Biomoleküle (wie z.B. DNA, Proteine, Fettsäuren) in ihrer unmittelbaren Umgebung an und schädigen den Organismus. Auf Dauer treten irreversible Schäden ein, weswegen die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als ein Schlüsselfaktor im Alterungsprozess gesehen werden.⁴

Die Natur hat mehrere Strategien entwickelt, um solche radikale Sauerstoffverbindungen zu entgiften, bevor diese zellschädigend wirken können (Abbildung 1.1):^{5,6,7}

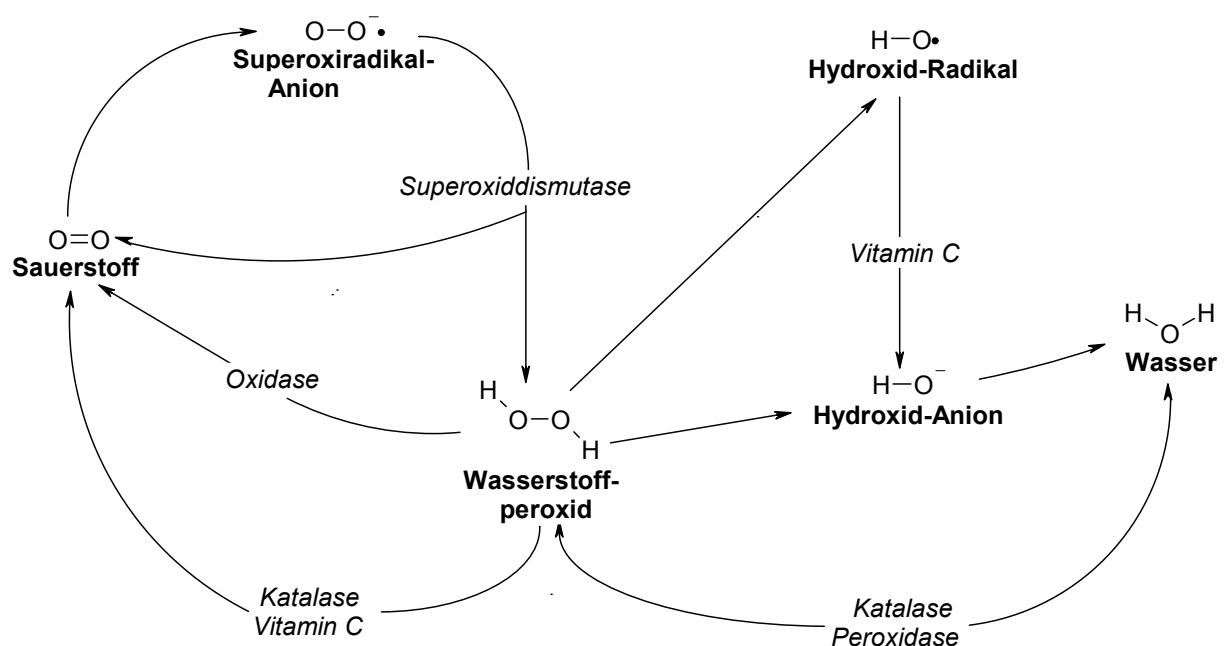


Abbildung 1.1: Natürliche Schutzmechanismen zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Einen Schlüsselfaktor in diesen Schutzmechanismen stellen die Superoxiddismutasen (EC 1.15.1.1) dar.⁸ Superoxiddismutasen (SOD) sind Metalloenzyme, die die Zelle vor oxidativen Schäden durch Superoxidradikal-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) schützt, indem sie $O_2^{\cdot-}$ zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff

1 Einleitung

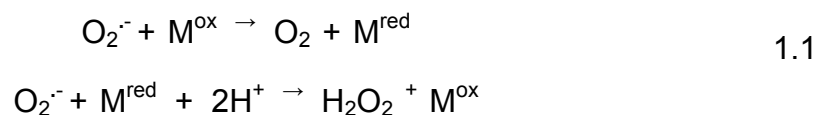
disproportionieren.⁵⁻⁸ Solche SODs sind mitunter die „schnellsten“ bekannten Enzyme und arbeiten gewöhnlich unter diffusionslimitierten Bedingungen.⁹

Die Cu/Zn-SODs^{10,11} bestehen aus zwei identischen Untereinheiten und besitzen ein katalytisches Kupferion und ein strukturgebendes Zinkion in den zweikernigen Aktivzentren. Dies sind auch die am schnellsten arbeitenden SODs.⁴ Die Fe/Mn-SODs^{12,13} können sowohl als Homodimere, wie auch als Homotetramere auftreten. Ein Fe-SOD Homodimer ist in Abbildung 1.2 illustriert. Im Gegensatz zu den Cu/Zn-Systemen enthält diese Enzymklasse ein mononukleares Aktivzentrum mit entweder einem zentralen Eisen- oder einem Manganion. Die Ligandenumgebung besteht gewöhnlich aus drei Imidazolringen (His) und einem Carboxylat (Asp). Die NiSODs^{14,15} sind Homohexamere mit einem Nickelion im katalytischen Zentrum. Als Liganden für das Nickelion dienen zwei Thiolat-Gruppen von Cysteinen und zwei Rückgratstickstoffatome.¹⁶

Die Nickel-Superoxiddismutasen wurden erst vor kurzer Zeit (1996) entdeckt.^{17,18,19} Sie unterscheiden sich deutlich von den anderen Superoxiddismutasen, was sowohl die Aminosäuresequenz als auch die Struktur des Aktivzentrums betrifft.^{16,20} Die bekannten Exemplare sind Homohexamere und enthalten ein Nickelion im Aktivzentrum, das durch eine außergewöhnliche makrozyklische „Haken“-Struktur gebunden wird.

Die am häufigsten vorkommenden SODs sind die Cu/Zn-SODs und die Fe/Mn-SODs. Diese sind unter anderem auch im menschlichen Körper zu finden.^{11,13} Die NiSODs sind bisher nur in schwermetallresistenten Bakterien²¹ sowie einigen Cyanobakterien^{22,23,24} gefunden worden. Diese Organismen besitzen neben den NiSODs auch beträchtliche Mengen an FeSOD. Unter normalen Umständen ist eher die FeSOD aktiv. Erst bei einem Überschuss an Nickelionen wird mehr NiSOD produziert und die Bildung von FeSOD wird gehemmt. Durch diese antagonistische Produktion der beiden SODs bleibt die SOD-Aktivität insgesamt konstant.^{25,26}

Die chemische Aufgabe für alle SODs ist dieselbe. Als Konsequenz dessen hat die NiSOD viele mechanistische Charakteristiken mit den anderen beiden SODs gemeinsam (z.B. ähnliche katalytische Geschwindigkeitskonstanten, pH-Abhängigkeiten, katalytische Funktionen, etc.) und wirkt über einen typischen „ping-pong“-Redoxmechanismus bestehend aus zwei Schritten:^{20,27}



Dabei steht M für ein Übergangsmetallion mit der Fähigkeit zu einer reversiblen Ein-Elektronen-Redoxreaktion (zum Beispiel $\text{Ni}^{\text{II}} \leftrightarrow \text{Ni}^{\text{III}} + \text{e}^-$).

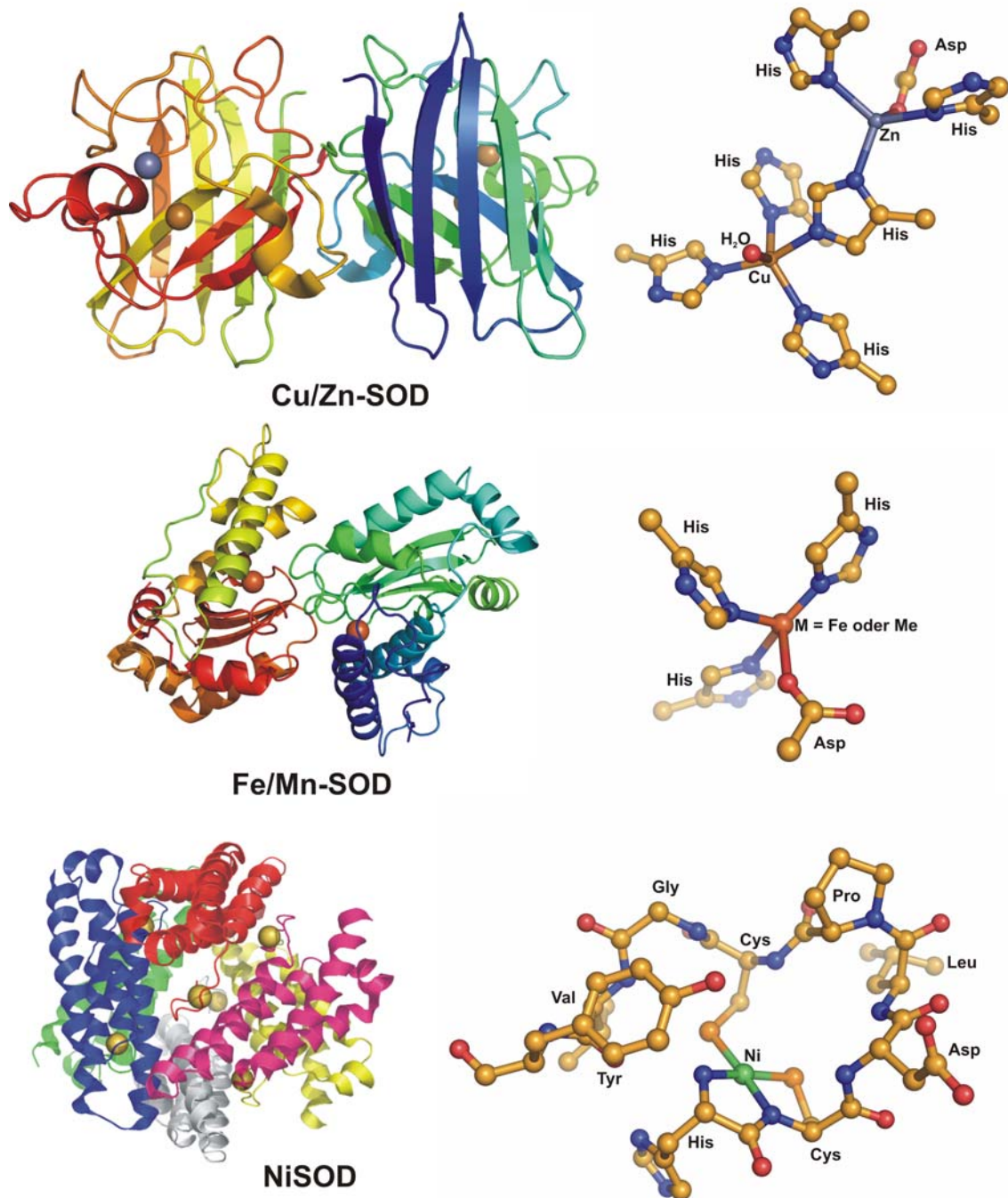


Abbildung 1.2: Enzymstrukturen und Aktivzentren der unterschiedlichen SODs, SODs von oben nach unten: der binukleare Cu/Zn-¹⁰ (*bos taurus erythrocyt*; pdb 2sod), mononukleare Fe/Mn-¹² (*e. coli*, pdb 1ISB) und die ebenfalls mononukleare Ni-SOD¹⁵ (*S. seoulensis*; pdb 1Q0M).

1 Einleitung

Die Aminosäuresequenz der NiSOD wurde von einem erst kürzlich isolierten sodN-Gen (verbreitet in *Streptomyces*^{20,27,28} und *Cyanobakterien*²²) synthetisiert. Sie ist erstaunlich kurz (117 Aminosäuren plus einer schützenden N-terminalen Verlängerung von 14 Resten) und enthält kein Nickel.^{29,30} Die Entfernung dieses N-terminalen Schutzes durch eine noch nicht identifizierte Aminopeptidase löst die Proteinfaltung und Aggregation (Bildung eines Homohexamers) unter irreversiblen Einbau von Ni^{II} aus. Danach ist die volle NiSOD-Aktivität zu beobachten.²⁹

Es sind Festkörperstrukturen für zwei unterschiedliche NiSODs (*S. seoulensis* and *S. coelicolor*) mit einer Auflösung von 1,68 bzw. 1,30 Å bekannt.^{14,15} Beide Varianten besitzen eine hexamere Makrostruktur bei der jede monomere Einheit ein Aktivzentrum mit einem kovalent gebundenen Nickelion besitzt. Interessanterweise besitzen beide NiSODs ein isostrukturelles Aktivitätszentrum, sofern die Umgebung in direkter Nachbarschaft zum Nickelion betrachtet wird. Unterschiede treten erst in der zweiten Koordinationssphäre auf. Eine dieser Strukturen (*S. coelicolor*)¹⁴ besitzt einen engen elektrostatischen Führungskanal mit drei Lysinresten, welche an einige mononukleare Fe/MnSODs^{31,32} erinnert. Bei diesem wird angenommen, dass er durch einen „outer sphere“-Mechanismus, in welchem keine direkte Metall-Substrat-Bindung involviert ist (Fixierung von O₂⁻ in der Nachbarschaft von Ni^{II} mit Elektronentransfer von Ni^{II} zum Substrat durch den Raum) funktioniert.³³ In der von *S. seoulensis* isolierten NiSOD gibt es keinen strukturellen Hinweis für einen elektrostatischen Führungskanal¹⁵ und frühere Studien haben demonstriert, dass k_{cat} nicht von der Ionenstärke des Mediums abhängt.¹⁶ Beide Fakten lassen vermuten, dass ein „inner-sphere“-Mechanismus bei dieser Variante wirkt, in dem eine direkte Ni^{II}-O₂⁻-Bindung vorkommt.¹⁵

Spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Metallzentrum leicht zwischen diamagnetischen Ni^{II} und paramagnetischen Ni^{III}-Zustand wechseln kann.^{34,35} Dabei ändert sich die Anzahl der Liganden am Nickelzentrum. In Übereinstimmung mit diesen Befunden kommen in den Festkörperstrukturen der NiSOD zwei unterschiedliche Nickel-Spezies vor, eine quadratisch planare N,N,S,S-Koordinationsgeometrie für die reduzierte Ni^{II}-Form und eine quadratisch pyramidale Geometrie für die Ni^{III}-Form in welcher His1(ε_N) axial koordiniert ist (Spezies 1 und 3 in Abbildung 1.3).^{14,15}

Im bisherigen Verständnis des „mode of action“^a der NiSOD, basierend auf experimentellen Ergebnissen^{14,15,29,34,35} wirkt unter Annahme eines „inner-sphere“-Mechanismus, welcher initiiert wird, wenn O₂⁻ (nachdem es wahrscheinlich durch einen elektrostatischen Kanal¹⁵ in das aktive Zentrum eintritt) an die unbesetzte axiale Stelle von Ni^{II} an der gegenüberliegenden Seite des His1-Restes bindet. Es ist möglich das Tyr9 sich etwas zur Seite bewegt, um einen direkteren Zugang des O₂⁻ zum zentralen Nickelion zu ermöglichen.³³ Es wird postuliert, das Tyr9

^a Beschreibt nicht einen einzigen Mechanismus, sondern vielmehr die Summe aller auf der Hyperfläche eines Enzyms nebeneinander existierenden Mechanismen.

und/oder das Rückgratamid des Cys6 das Superoxidradikal-Anion abfängt und für einen anschließenden Ein-Elektronen-Transfer ($\text{Ni}^{\text{II}} \rightarrow \text{Ni}^{\text{III}}$) optimal ausrichtet, welcher von einer Doppelprotonierung durch bisher unidentifizierte generelle Säuren in der direkten Nachbarschaft des Aktivzentrums begleitet wird.¹⁴ Das nun gebildete H_2O_2 wird vom Aktivzentrum durch His1 verdrängt, welches von der Rückseite angreift, um die pentakoordinierte oxidierte Form 3 zu stabilisieren.

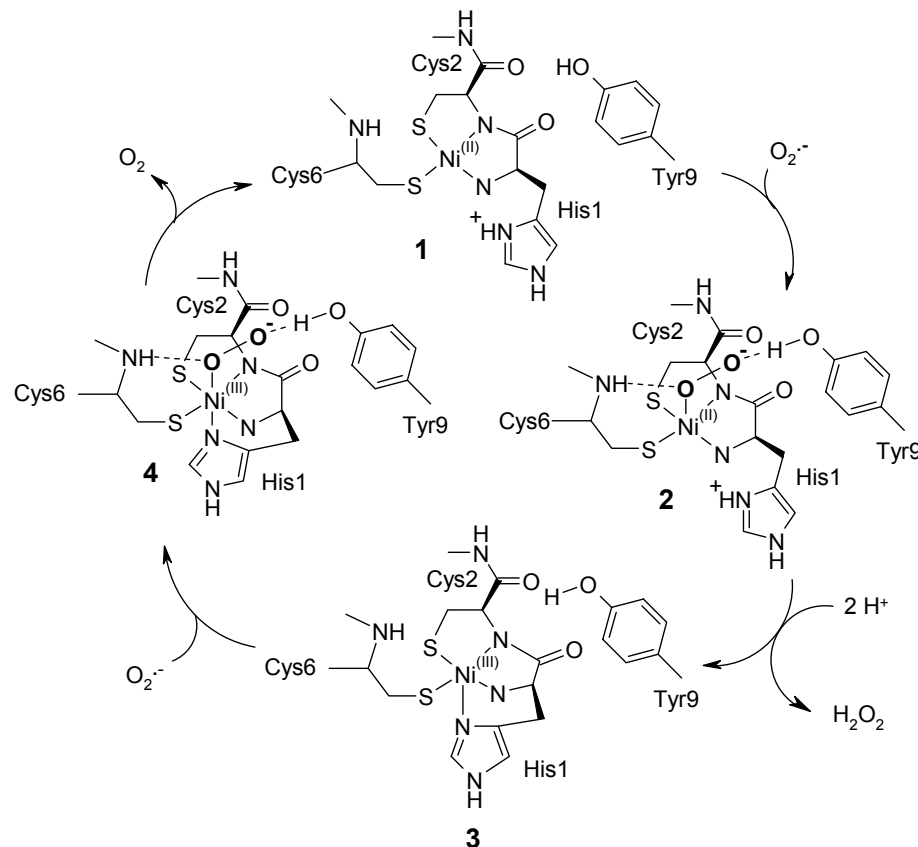


Abbildung 1.3: Bisheriges Verständnis des “*mode of action*” der NiSOD basierend auf experimentellen Beweisen

In der zweiten Hälfte des katalytischen Zyklus wird vermutet, dass das Intermediat 3 ein zweites $\text{O}_2^{\cdot -}$ akzeptiert, welches wiederum vermutlich durch Tyr9 und Cys6 positioniert wird, um ein hexakoordiniertes Intermediat oder die Übergangsstruktur 4 zu bilden. Ein Ein-Elektronen-Transfer in die entgegengesetzte Richtung ($\text{Ni}^{\text{III}} \rightarrow \text{Ni}^{\text{II}}$) generiert O_2 , welches zusammen mit His1 sofort von der Koordinationssphäre des neu erzeugten Ni^{II} -Ions entlassen wird, da dies eine quadratisch planare Koordinationssphäre deutlich bevorzugt.

Quantenchemische Studien neueren Datums haben demonstriert, dass dieser Katalyseablauf sehr stark vereinfacht ist.^{36,37,38} Eine Vielzahl möglicher Intermediate und Mechanismen sind prinzipiell möglich. Unser Verständnis der einzelnen mechanistischen Details ist weiterhin durch die Möglichkeit

1 Einleitung

unterschiedlichster Protonenquellen, sowie durch einen variablen Spin (high oder low) am Nickelion erschwert. Zum Beispiel schlug eine dieser Studien vor, dass O_2^- bereits beim Annähern an das Aktivzentrum protoniert wird. Ein Hydroperoxyradikal ($^{\bullet}OOH$) wird gebildet, das dann am zentralen Nickelion andockt.³⁶ Andere Studien vermuten, dass der erste Schritt einer Endkoordination von O_2^- am Ni^{II} begleitet von einem Ein-Elektronen-Transfer von Ni^{II} zu O_2^- sein könnte.³⁷ Dadurch können zwei unterschiedliche Intermediate entstehen - ein $Ni^{III}-O_2^-$ -Spezies oder eine $Ni^{III}-OOH$ Spezies (der mögliche Protonendonator ist dabei das Rückgratamid in Cys6).³⁷ Die Protonen, die zur Produktion von H_2O_2 benötigt werden, können aus unterschiedlichen Quellen stammen. Mögliche Protonendonoren wären die Seitenketten der Tyr9-, His1- und Asp3-Reste sowie das Rückgratamid in Cys6.³⁷ Es ist klar, dass weitere ausgiebige Arbeiten experimenteller, wie auch quantenchemischer Natur notwendig sind, bevor ein detailliertes Verständnis der einzelnen Schritte der katalytischen Umsetzung erreicht wird.

Alle bekannten NiSODs werden durch ein N-terminales „Nickelhaken“-Aktivzentrum charakterisiert (Abbildung 1.4). Dies ist eine Sequenz von neun konservierten Aminosäuren (His1-Cys2-X3-X4-Pro5-Cys6-Gly7-X8-Tyr9).

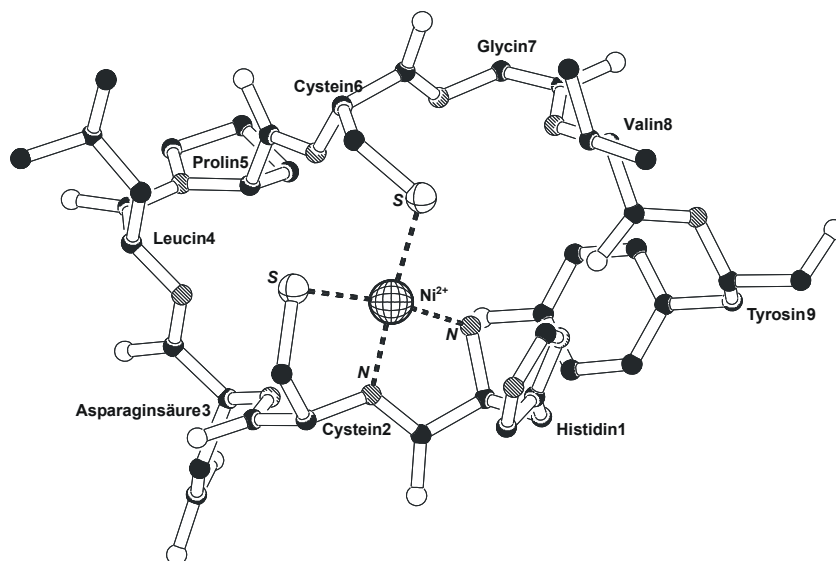


Abbildung 1.4: Struktur des Nickelhakens aus der Festkörperstruktur der NiSOD¹⁵ (*S. seoulensis*; pdb 1Q0M)

In der Abwesenheit von Nickel ist das Aktivzentrum ungeordnet.¹⁴ Es wird vermutet, dass die Nickelkoordination die lokale Proteinkonformation bestimmt.³⁹ Die meisten, wenn nicht alle, für die Nickelbindung essentiellen Wechselwirkungen werden von der Peptidsequenz bereitgestellt. Die Faltung um das Nickelion erinnert an eine Art organometallischen Makrozyklus.^{14,15}

Falls ein „*inner-sphere*“-Mechanismus vorhanden ist, sollte der Hauptteil des Enzyms grundsätzlichen Ballast darstellen. Obwohl der Einfluss der zweiten Koordinationssphäre höchstwahrscheinlich die Aktivität modifiziert und/oder optimiert, sollte die Hakenstruktur an sich eigentlich ein generell funktionsfähiges Biomimetikum für die NiSOD darstellen.

In dieser Arbeit wurde ein Biomimetikum bestehend aus den ersten neun Aminosäuren des Nickelhakes der NiSOD (His1-Cys2-Asp3-Leu4-Pro5-Cys6-Gly7-Val8-Tyr9) hergestellt. Neben der Aufklärung der 3D-Struktur dieses Biomimetikums in Lösung, erfolgten SOD-Aktivitätstests. Dabei wurde nachgewiesen, dass der Nickelhaken ein funktionelles Biomimetikum ist.

Parallel zu dieser Arbeit wurde ein ähnliches Biomimetikum von Shearer und Long untersucht. Sie demonstrierten, dass ein Nickelkomplex, basierend auf den ersten zwölf Aminosäuren des Nickelhakens der NiSOD-Sequenz (enthält den Nickelhaken) ein funktionsfähiges Biomimetikum ergibt.⁴⁰

Zur näheren Untersuchung des „*mode of action*“ wurden Mutationsexperimente am Nonapeptid durchgeführt. Dazu wurden einige für die NiSOD essentiellen Aminosäuren durch Alanin ausgetauscht, sowie Verkürzungen der Peptidsequenz vorgenommen. Die Ergebnisse werden in der vorliegenden Arbeit zusammen mit quantenchemischen Studien (in Zusammenarbeit mit Stefan Zahn) diskutiert. Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines funktionsfähigen Minimalmodells der NiSOD.

2 Synthese

Die Nonapeptidkette wurde mit Hilfe der manuellen Festphasensynthese nach Merrifield⁴¹ synthetisiert. Dabei werden an einen unlöslichen polymeren Träger (Polymerharz) schrittweise α -Amino- und Seitenketten-geschützte Aminosäuren nacheinander gekoppelt (Abbildung 2.1). Die Peptidkette ist über einem Linker mit dem Polymerharz verbunden. Es kommt zur Ausbildung von Amidbindungen zwischen der jeweils neu eingeführten Aminosäure und dem C-terminalen Rest der wachsenden Peptidkette. Die α -Amino-Schutzgruppe des letzten Aminosäurerests wird jedes Mal abgespalten, bevor die nächste Aminosäure angefügt wird. Dies geschieht, je nach Schutzgruppe, entweder unter säure- oder basenkatalysierten Bedingungen. Für die Bildung der Amidbindungen werden Standardkopplungsreagenzien eingesetzt. Nach der Synthese des Peptides wird es vom Harz abgespalten, dabei werden, je nach Bedarf, die Seitenkettenschutzgruppen mit entfernt. Die Synthese erfolgt bei den meisten Polymerharzen (wie Rink-Amid-Harz) entgegen der natürlichen Proteinbiosynthese vom C- zum N-Terminus.

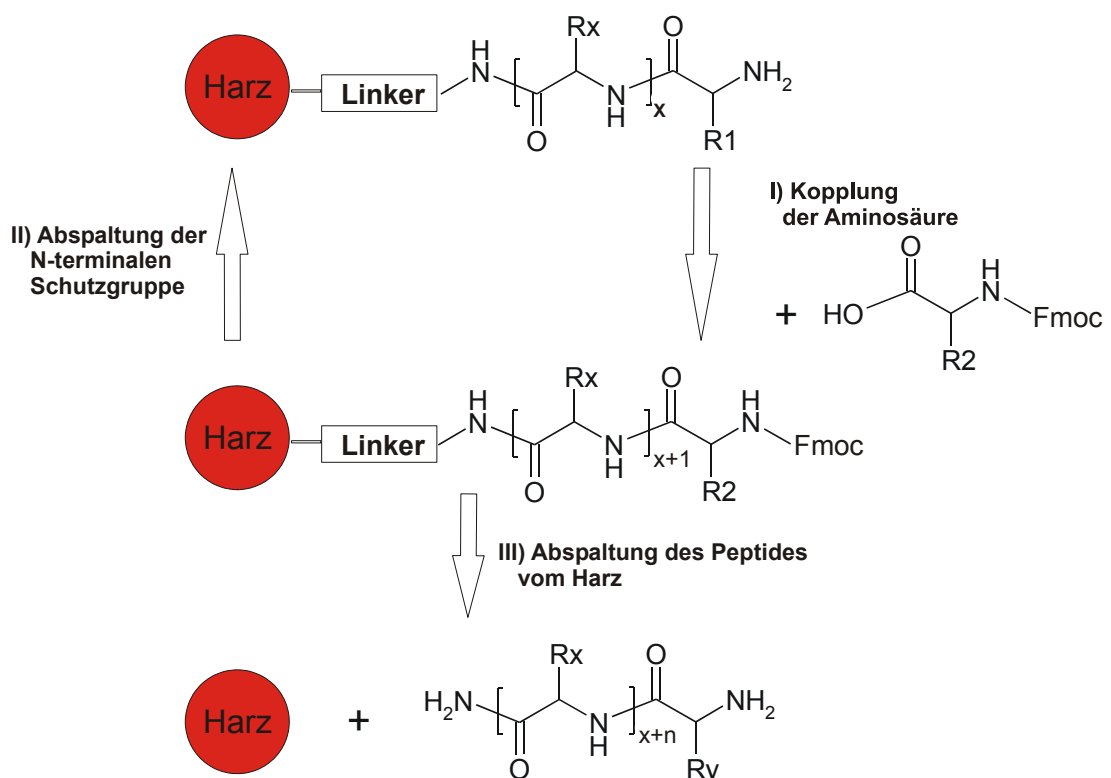


Abbildung 2.1: Prinzip der Peptidsynthese nach Merrifield für Peptide

Das Nonapeptid wurde an Rink-Amid-MBHA-Harz [4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxyacetamido-norleucyl-MBHA-Harz] synthetisiert. Als

2 Synthese

Lösungsmittel diente DMF. Die Synthese erfolgte nach der Fmoc-Strategie.⁴² Dabei wurden Fmoc(9-Fluorenyl-methyloxycarbonyl)-geschützte Aminosäuren zum Schutz der N^α-Funktionalitäten verwendet. Die basenlabile Fmoc-Schutzgruppen wurden jeweils mittels 20% Piperidin/DMF abgespalten. Als Seitenkettenschutzgruppe wurde die säurelabile t-Butylgruppe für die COOH-Gruppe der Asparaginsäure sowie der OH-Gruppe des Tyrosins verwendet. Die Trityl-Gruppe diente zum Schutz der Thiolgruppe des Cysteins und der Imidazolgruppe von Histidin. Unter den verwendeten Bedingungen für die Abspaltung des Nonapeptids vom Harz wurden die Schutzgruppen der Seitenketten in diesem Schritt mit abgespalten.

Für die Kopplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren wurde ein HBTU/HOBt-Gemisch verwendet.⁴³ HBTU und HOBt gehören zu den Kopplungsreagenzien, die aus der Carboxylgruppe der zu koppelnden Fmoc-Aminosäure zunächst einen Aktivester erzeugen, der dann aminolytisch an der Aminogruppe gespalten wird (Abbildung 2.2).

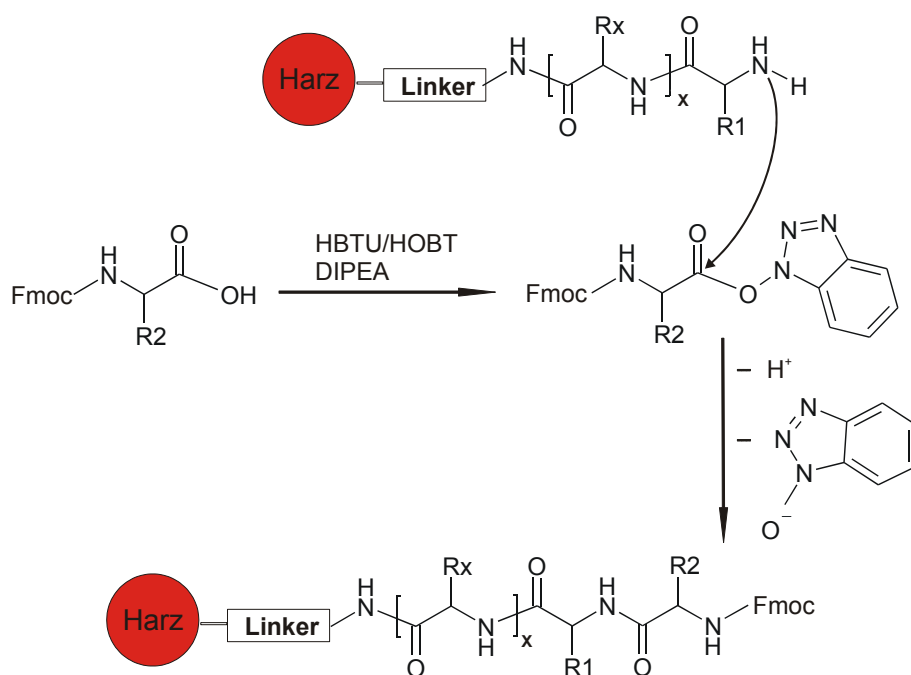


Abbildung 2.2: Bildung des OBt-Aktivesters mit anschließender Peptidkopplung

HBTU hat den Vorteil gegenüber N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC), dass weniger Nebenprodukte entstehen.⁴⁴ HBTU benötigt eine Base wie z.B. Diisopropylethylamin (DIPEA) zur Aktivierung, welche aber Fmoc nicht abspalten darf. HOBt als sekundäre Aktivierungsreagenz wurde zur Erhöhung der Ausbeute und zur Vermeidung einer Razemisierung eingesetzt.⁴⁵ Einzige Ausnahme war Fmoc-Cys(Trt)-OH^{46,47}, da diese zur Razemisierung im Basischen neigt. Daher wurde für die Kopplung dieser Aminosäure DIC mit HOBt verwendet. Das hierbei

verwendete HOBt diente wiederum dazu, eine Razemisierung zu vermeiden und die Ausbeute zu erhöhen. Um einen möglichst vollständige Umsatz zu erhalten, wurde die Kopplung jeweils wiederholt.

Die Beladung des Harzes wurde mittels Fmoc-Bestimmung überprüft.⁴⁸ Bei der basenkatalysierten Fmoc-Abspaltung bildet die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin zunächst Dibenzofulven, das sofort mit Piperidin zu einem tertiären Amin weiterreagiert (Abbildung 2.3). Das Dibenzofulven-Piperidin-Adukt weist eine starke Absorption bei $\lambda = 301 \text{ nm}$ auf und kann daher zur UV-spektroskopischen Ausbeutebestimmungen herangezogen werden. Der Extinktionskoeffizient liegt bei $7000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E = \varepsilon \cdot c \cdot d$) kann die Fmoc-Konzentration berechnet und somit die Beladung bestimmt werden.

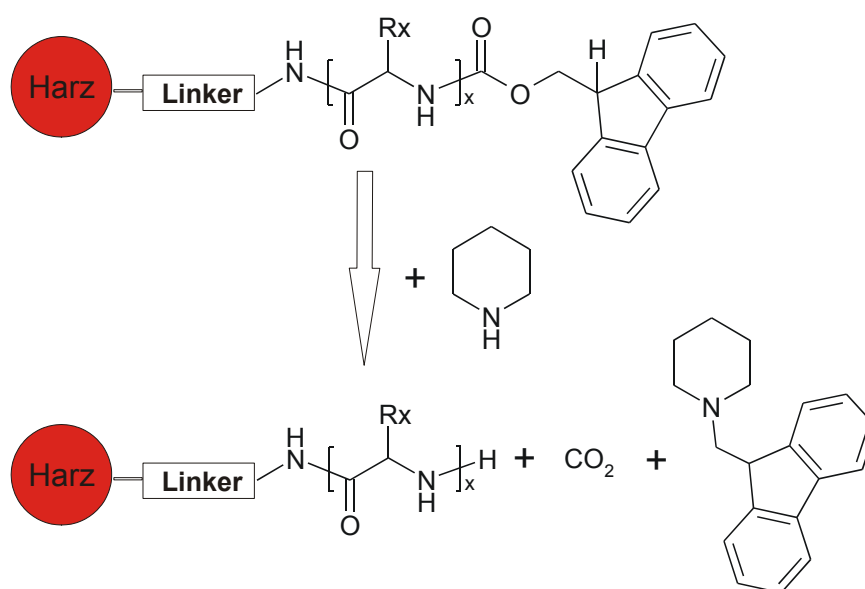


Abbildung 2.3: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin

Bei der Abspaltung der synthetisierten Sequenz vom Amidharz mit wässriger Trifluoressigsäure (TFA) und Triisopropylsilylan nach vollendeter Peptidsynthese entsteht aufgrund des Amidlinkers keine Säure, sondern ein Säureamid. Die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen wurden bei diesem Schritt mit vom Nonapeptid abgespalten. Das Triisopropylsilylan diente zum Abfangen der abgespaltenen Schutzgruppen. Die weitere Aufreinigung geschah mittels semi-präparativer HPLC.

Die Ausbeute des Rohpeptids lag nach der Abspaltung bei ca. 90%, davon konnte nach der semipräparativen HPLC-Aufreinigung 60% aufgereinigtes Nonapeptid (HPLC-rein) gewonnen werden. Die Verluste lassen sich durch schlechtes Lösungsverhalten (trübe Lösung) in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch zurückführen. Die Reinheit wurde mit analytischer HPLC überprüft und lag bei

2 Synthese

> 95%. Das Nonapeptid wurde anschließend gefriergetrocknet (Lyophilisator) und bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert.

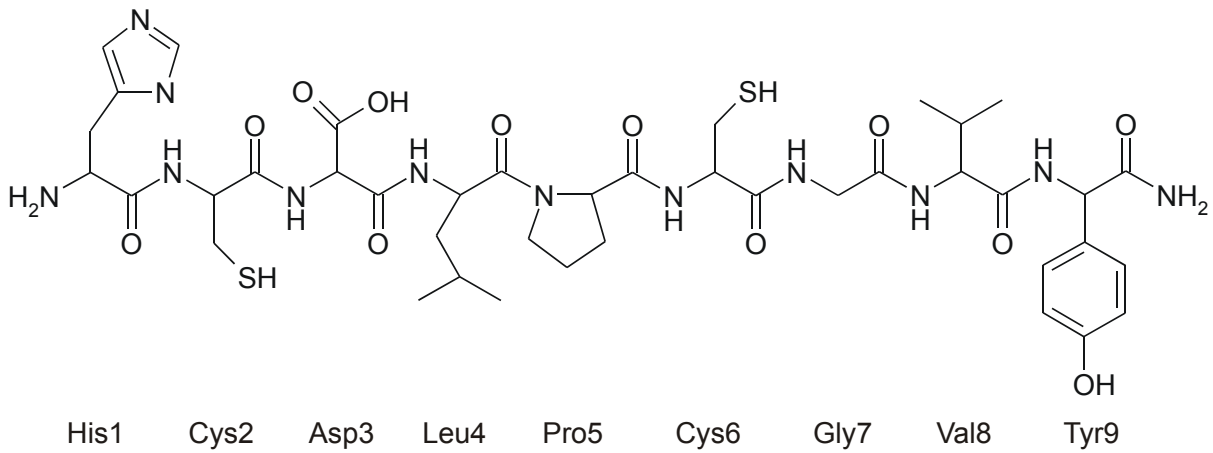


Abbildung 2.4: Sequenz des synthetisch hergestellten Nonapeptids

3 Charakterisierung

Damit sichergestellt werden konnte, dass das mittels HPLC aufgereinigte Nonapeptid keine nennenswerten Konzentrationen von nicht trennbaren Nebenprodukten enthält, wurde die Dünnschichtchromatographie herangezogen. Dabei konnten keine weiteren Substanzen entdeckt werden.

Das Verhältnis der Aminosäuren zueinander im Nonapeptid wurde mit Hilfe einer Standard-Aminosäurenanalyse bestätigt, sowie der Peptidgehalt von Proben in der festen Phase bestimmt. Hierfür wurde das Nonapeptid in HCl vollständig hydrolysiert. Anschließend wurden die Mengen der einzelnen Aminosäuren in der hydrolysierten Lösung mit einem Aminosäureanalytiker ermittelt. Die Bestimmung erfolgte im Aminosäuren-Chromatogramm. Dazu werden die Aminosäuren mit Hilfe von Ninhydrin (Entstehung eines blauvioletten Farbstoffes) bei 570 nm (440 nm für Prolin) anhand eines geeichten Aminosäurestandards detektiert.⁴⁹ Die Berechnung des Integrals der einzelnen Signale und der Vergleich mit dem Aminosäurestandard erlaubten eine Mengenangabe für die im Nonapeptid enthaltenen Aminosäuren. Die Menge des Cysteins und des Tyrosins konnte nicht bestimmt werden, da sie bei der sauren Hydrolyse teilweise zerstört wurden.⁵⁰ Alle anderen Aminosäuren stehen im gleichen Verhältnis zueinander, jede Aminosäure (bis auf Cystein) ist damit einmal im Nonapeptid vorhanden.

Während der Abspaltung und HPLC-Aufreinigung lagerte das Nonapeptid TFA-Salz an, welches nach der Gefriertrocknung noch enthalten war. Neben dem im Peptidpulver enthaltenen Salz ist zusätzlich noch Wasser, aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften des Nonapeptides, eingelagert. Die Gefahr der Polymerisierung des Nonapeptides in Lösungen war nicht genau abzuschätzen und zudem wurden unterschiedlichste Lösungen benötigt. Daher wurde keine Stammlösung tiefgefroren, sondern das Nonapeptid wurde als Feststoff bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert. Bei jeder neuen Einwaage konnte der Peptidanteil in den Proben durch weitere Wassereinlagerung variieren. Vor Experimenten, bei denen die genaue Peptidmenge von Bedeutung war, wurde daher der Peptidgehalt bestimmt. Der Peptidgehalt der Proben lag im Bereich von 50 bis 60%.

Zur Kontrolle der Molmasse wurde die ESI (Elektrospray Ionisation)-Massenspektrometrie^{51,52} verwendet. Die theoretische Molmasse von 1005,2 g/mol konnte durch die ESI-Massenspektrometrie bestätigt werden (Abbildung 3.1). Bei 1006 m/z konnte Nonapeptid + H^+ , bei 1027 m/z Nonapeptid + Na^+ und bei 1048 m/z Nonapeptid + K^+ -Spezies belegt werden. Dimere des Nonapeptides konnten nur in Spuren nachgewiesen werden. Als Lösungsmittel wurde Methanol verwendet, da Messungen in wässrigen Lösungen nicht durchgeführt werden konnten, weil das Nonapeptid in solchen Lösungen nicht in die Gasphase überführt werden konnte.

3 Charakterisierung

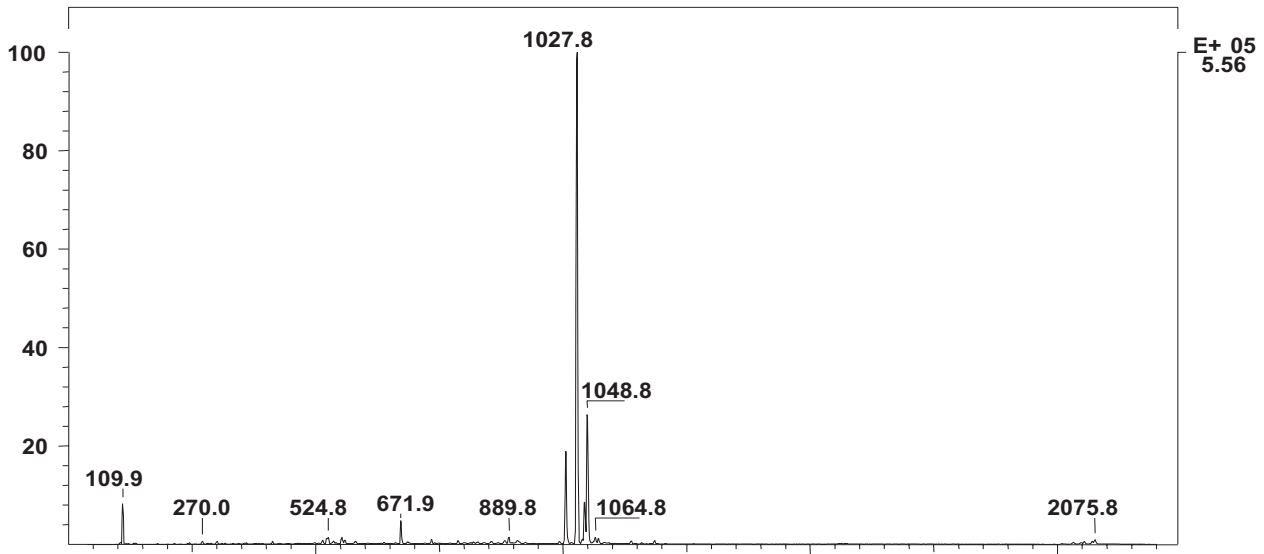


Abbildung 3.1: ESI-MS des Nonapeptides 1027 Na⁺-Peak, 1048 K⁺-Peak

Für eine genauere Charakterisierung wurden verschiedene NMR-Experimente⁵³ in D₂O und DMSO-d₆ durchgeführt. Das Lösungsmittel hat keinen großen Einfluss auf die NMR-Spektren. Sowohl die ¹H- als auch die ¹³C-Spektren aufgenommen in DMSO oder D₂O sind nahezu identisch. Die ¹H-NMR-Spektren (Abbildung 3.2) des Nonapeptides zeigten eine außergewöhnlich hohe Auflösung aller Signalsätze. Normalerweise tendieren Oligopeptide aufgrund konformationeller Instabilität oft zu verbreiterten Signalen.⁵⁴ Diese scharfen Spektren des Nonapeptides könnten somit auf eine Vorzugskonformation des Nonapeptides hindeuten.

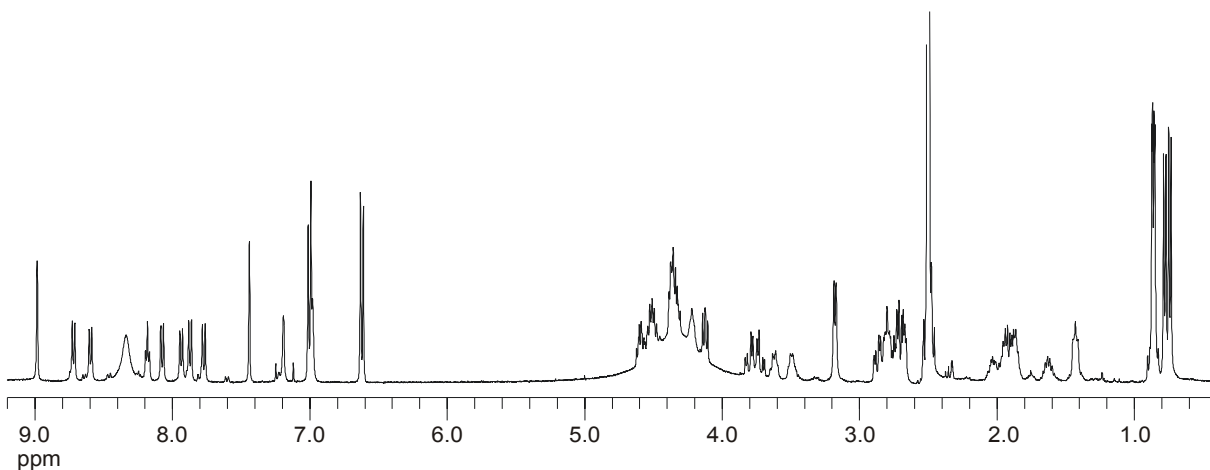


Abbildung 3.2: ¹H-Spektrum des Nonapeptides in DMSO-d₆

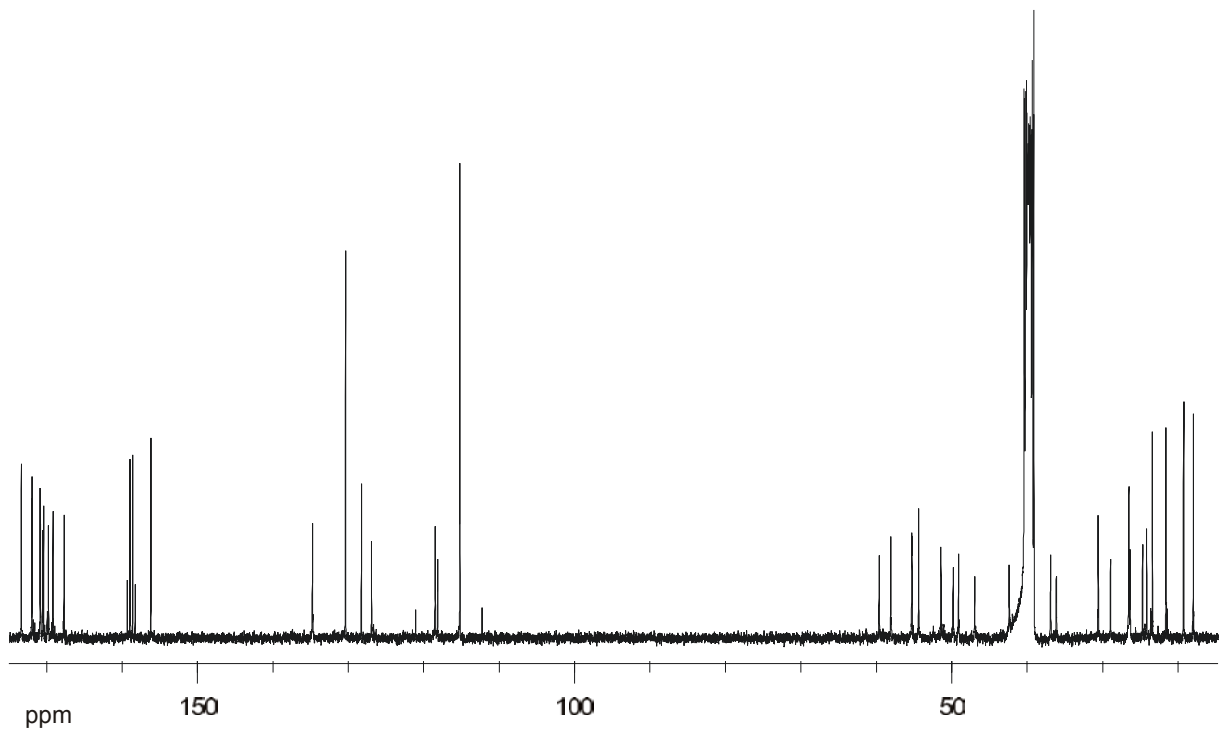


Abbildung 3.3: ^{13}C -Spektrum des Nonapeptides in DMSO-d₆

Anschließend wurde die Temperaturabhängigkeit der Peptidkonformation überprüft. Dabei wurde bei einer Peptidlösung in DMSO-d₆ die Temperatur von 300K (27°C) in 10 Kelvin-Abständen auf 350K (77°C) erhöht (Abbildung 3.4). Es traten kaum Änderungen im Spektrum auf. Nach Abkühlen auf 300K wurde erneut ein Spektrum aufgenommen, dass mit dem ursprünglichen Spektrum identisch war. Das bei höheren Temperaturen verschwindende breite Signal bei ca. 8,35 ppm zeigt das C-Terminale H^{N} an und verschwindet durch einen verstärkten Protonenaustausch in der Wärme. Ansonsten ist nur noch die geringfügige Verschiebung einiger Signale zu erkennen.

Dieses Experiment weist auf eine ungewöhnliche Konformationsstabilität gegenüber Temperaturerhöhungen hin. Dies kann als weiterer Hinweis auf eine Vorzugskonformation gewertet werden.

3 Charakterisierung

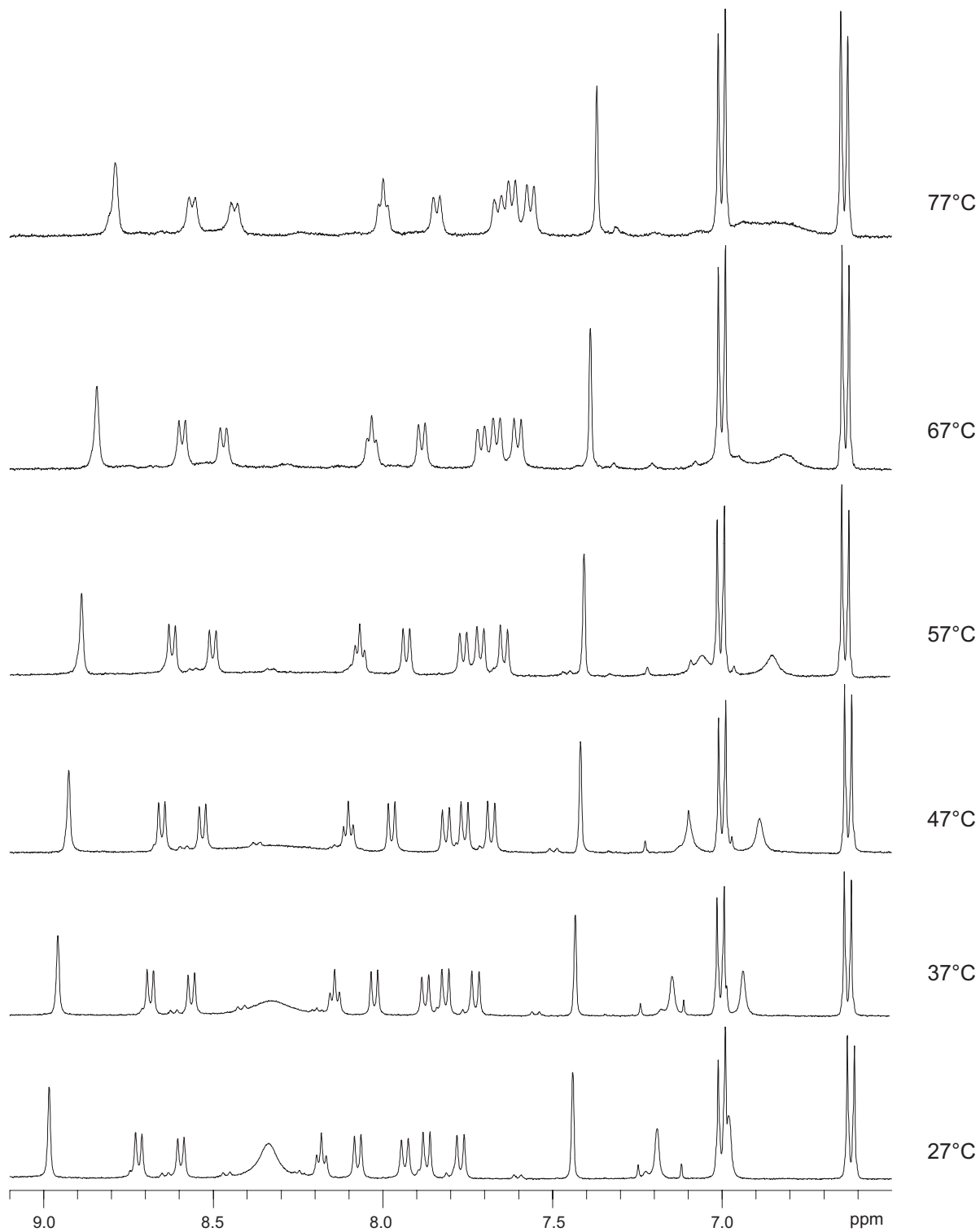


Abbildung 3.4: Temperaturabhängigkeit des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Nonapeptides im Bereich von 6 bis 9 ppm; ein ähnliches Verhalten wird im Bereich von 0 bis 6 ppm ebenfalls beobachtet.

Neben ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden auch 2D-Experimente, darunter COSY, TOCSY und HSQC-DEPT-Messungen (Beispiel Abbildung 3.6) für die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C Signale durchgeführt. Die restlichen Spektren sind im Anhang zu finden.

Protonenkoppeltes ^{13}C -Spektrum in DMSO-d6 (δ in ppm):

$\delta = 172,9; 171,5; 171,4; 170,4; 170,3; 170,0; 170,0; 169,0; 168,7;$
 $167,3$ (9 C^1 -Signale aller Aminosäuren sowie C^γ Asp); $155,75$ (C^ζ Tyr);
 $134,4$ (C^ϵ His1); $130,0$ (C^ϵ Tyr9); $128,0; 126,5$ (C^γ His1, Tyr9)
 $114,9$ (C^ϵ Tyr9) $118,2$ (C^δ His1)
 $59,4; 57,9; 55,09; 55,05; 54,16; 51,20; 49,58; 48,88$ (8 C^αH aller AS);
 $46,71$ (C^δ Pro5); $42,18$ ($\text{C}^\alpha\text{H}_2$ Gly7); $40,07$ (C^β Leu4);
 $36,66; 35,95$ (C^β Asp3, Tyr9); $30,41; 30,36$ (C^β Pro5, Val8); $28,76$ (C^β His1);
 $26,30; 26,14$ ($2 \cdot \text{C}^\beta$ Cys2 und Cys6); $24,51$ (C^γ Pro5); $23,97$ (C^γ Leu4);
 $23,20; 21,42$ ($\text{C}^\delta, \text{C}^{\delta'}$ Leu4); $19,08; 17,80$ ($\text{C}^\gamma, \text{C}^{\gamma'}$ Val8).

Zuordnung der ^1H -Signale in DMSO-d6 (δ in ppm):

$\delta = 9,0$ (His1 $\text{H}^{\text{C}\epsilon}$); $8,7$ (Cys2 H^{N}); $8,4$ (Asp3 H^{N}); $8,2$ (Gly7 H^{N} , C-Term NH_2);
 $8,1$ (His1 H^{N}); $8,0$ (Cys6 H^{N}); $7,9$ (Tyr H^{N}); $7,8$ (Leu H^{N}); $7,7$ (Val H^{N});
 $7,4$ (His1 $\text{H}^{\text{C}\delta}$); $7,2$ (Tyr9 H^{OH}); $7,0$ (Tyr9 $\text{H}^{\text{C}\epsilon}$); $6,6$ (Tyr9 $\text{H}^{\text{C}\delta}$);
 $4,1 - 4,7$ (His1, Cys2/6, Asp3, Leu4, Pro5, Val7, Tyr9 $\text{H}^{\text{C}\alpha}$);
 $3,8$ (Gly7 $2\text{H}^{\text{C}\alpha}$); $3,6$ (Pro5 $2\text{H}^{\text{C}\delta}$);
 $3,2$ (His1 $2\text{H}^{\text{C}\beta}$); $2,7-2,9$ (Cys2/6, Tyr9 $6\text{H}^{\text{C}\beta}$);
 $1,8 - 2,1$ (Pro5 $2\text{H}^{\text{C}\beta}$, Pro5 2H^γ , Val8 $\text{H}^{\text{C}\beta}$); $1,6$ (Leu4 $\text{H}^{\text{C}\gamma}$); $1,4$ (Leu4 $2\text{H}^{\text{C}\beta}$);
 $0,9$ Leu4 $6\text{H}^{\text{C}\delta, \text{C}\delta'}$; $0,7$ (Val8 $6\text{H}^{\text{C}\gamma, \text{C}\gamma'}$);

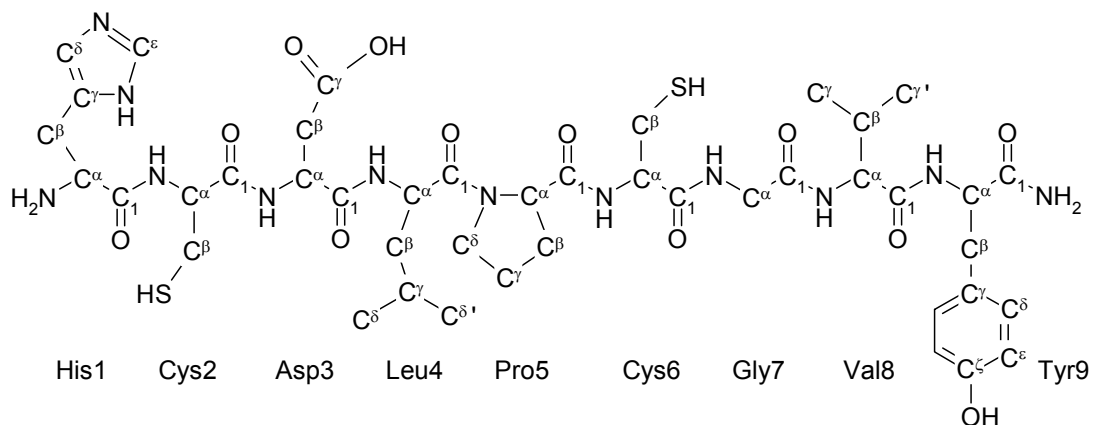


Abbildung 3.5: Bezeichnung der C-Atome in den Aminosäuren für die Zuordnung der ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Signale

3 Charakterisierung

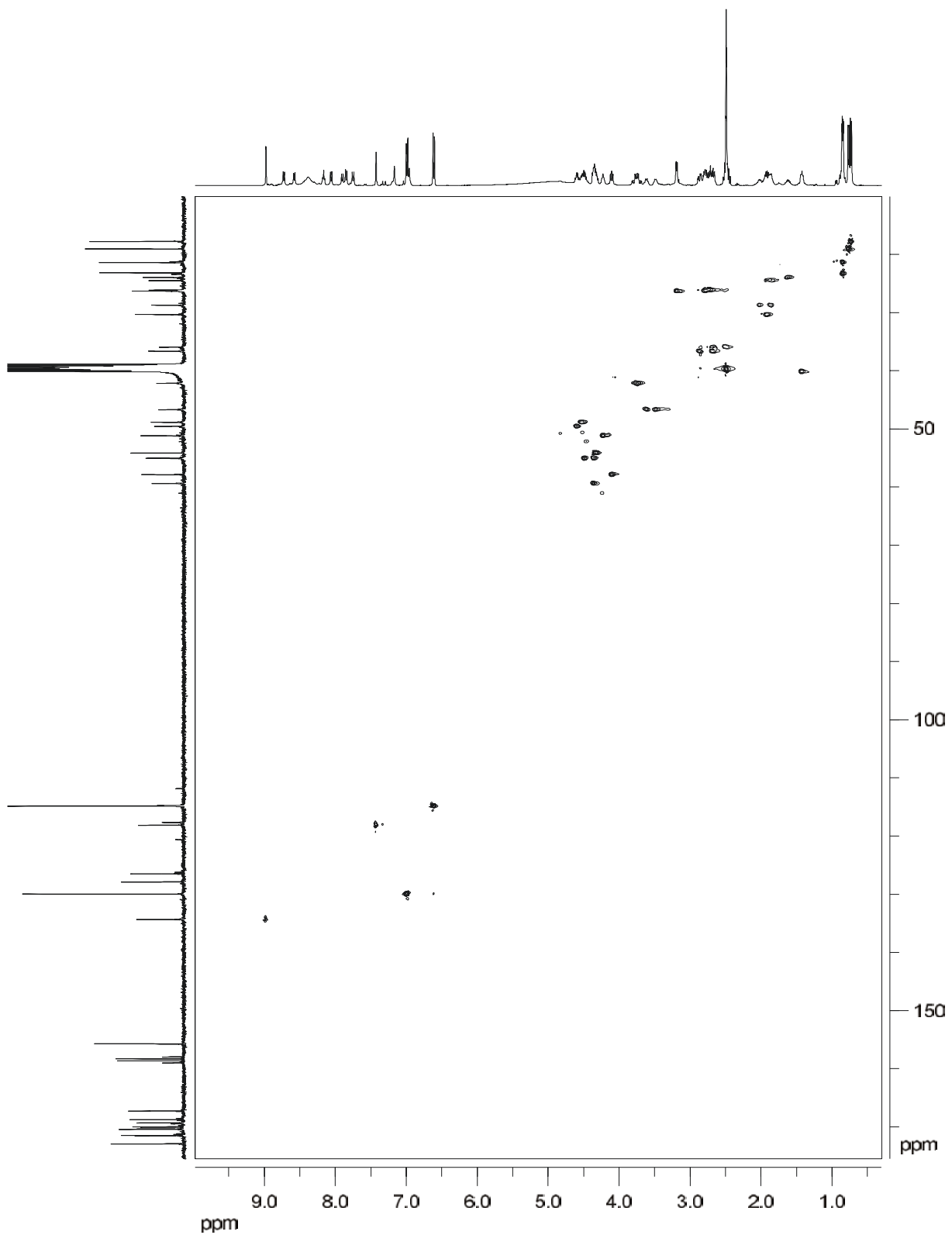


Abbildung 3.6: $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC-DEPT-Spektrum des Nonapeptids aufgenommen in DMSO-d₆ bei Raumtemperatur (x-Achse ^1H , y-Achse ^{13}C)

4 Komplexierung

4.1 Massenspektroskopie

Zur Untersuchung der Komplexierung von Nickelionen durch das Nonapeptid wurde zuerst eine 1 mM methanolische Lösung des Nonapeptides mit zwei äquivalenten $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2$ versetzt. Anstelle von $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2$ kann auch NiCl_2 verwendet werden. Es gibt keine Anhaltspunkte, dass dies eine Rolle für die Komplexierung spielt. Eindeutig konnte ein [1:1] Nickel(II)-Nonapeptidkomplex in Methanol mittels ESI-MS nachgewiesen werden. Mit 1061 g/mol stimmt die gemessene Molmasse mit der theoretischen überein (Abbildung 4.1). Als weiteren Beweis für einen Nickel(II)-Nonapeptidkomplex gleichen sich das theoretische wie auch das gemessene Isotopenmuster (Abbildung 4.2) des Nickelkomplexes. Neben dem monomeren Nickel(II)-Nonapeptidkomplex sind auch geringe Mengen eines [1:2] Nickel(II)-Nonapeptidkomplexes mit einer Molmasse von 2066 g/mol vorhanden.

Die erste Messung der [2:1] Nickel-Nonapeptidlösung zeigte, neben dem erwarteten [1:1] Ni^{II} -Nonapeptidkomplex, einen großen Anteil an unkomplexiertem Nonapeptid. Nach 24 Stunden zeigte eine zweite Messung, dass eine fast vollständige Komplexierung des Nonapeptides mit Nickelionen vorlag. Nach etwa einer Woche (Lagerung der Nickel-Nonapeptidlösung bei 5°C) war kaum noch freies Nonapeptid vorhanden (Abbildung 4.1). Der Grund hierfür ist möglicherweise eine langsame Einstellung des Komplexierungsgleichgewichtes in Methanol. Eventuell werden die Thiolgruppen der Cysteine in Methanol nur sehr langsam deprotoniert.

Bei der ESI-Messung (nach einem Tag Lagerung bei 5°C) einer 1 mM methanolischen Nickel-Nonapeptidlösung mit gleichen Ni^{II} /Nonapeptid-Verhältnis (1:1) lag dagegen keine vollständige Komplexierung vor (Abbildung 4.2). Auch nach längerer Lagerung (drei Wochen bei 5°C) konnte diese nicht beobachtet werden.

Ein denkbarer Grund für dieses Verhalten wäre das Vorhandensein eines Gleichgewichtes zwischen freiem und Ni^{II} -komplexiertem Nonapeptid. Erst ein Überschuss an Nickelionen verschiebt das Gleichgewicht so weit in Richtung Ni^{II} -Peptidkomplex, dass kein freies Nonapeptid mehr vorhanden ist.

4 Komplexierung

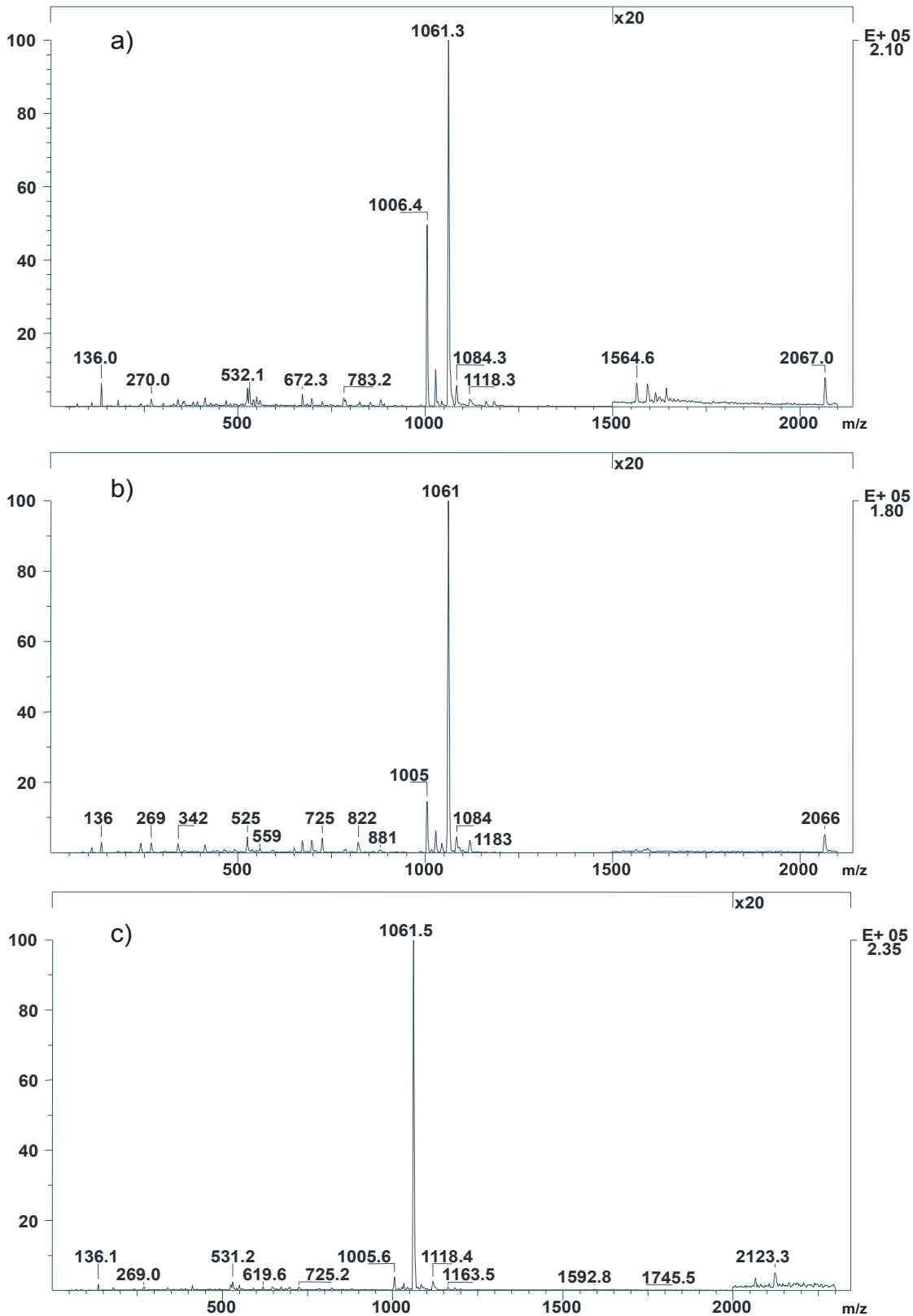


Abbildung 4.1: ESI-Massenspektren einer Nonapeptidlösung mit zwei eq. Ni^{II}, 1006 m/z entspricht Nonapeptid, 1061 m/z entspricht [1:1] Ni^{II}-Peptidkomplex; (a) sofortige Messung, (b) nach einem Tag, (c) nach einer Woche (Lagerung bei 5°C)

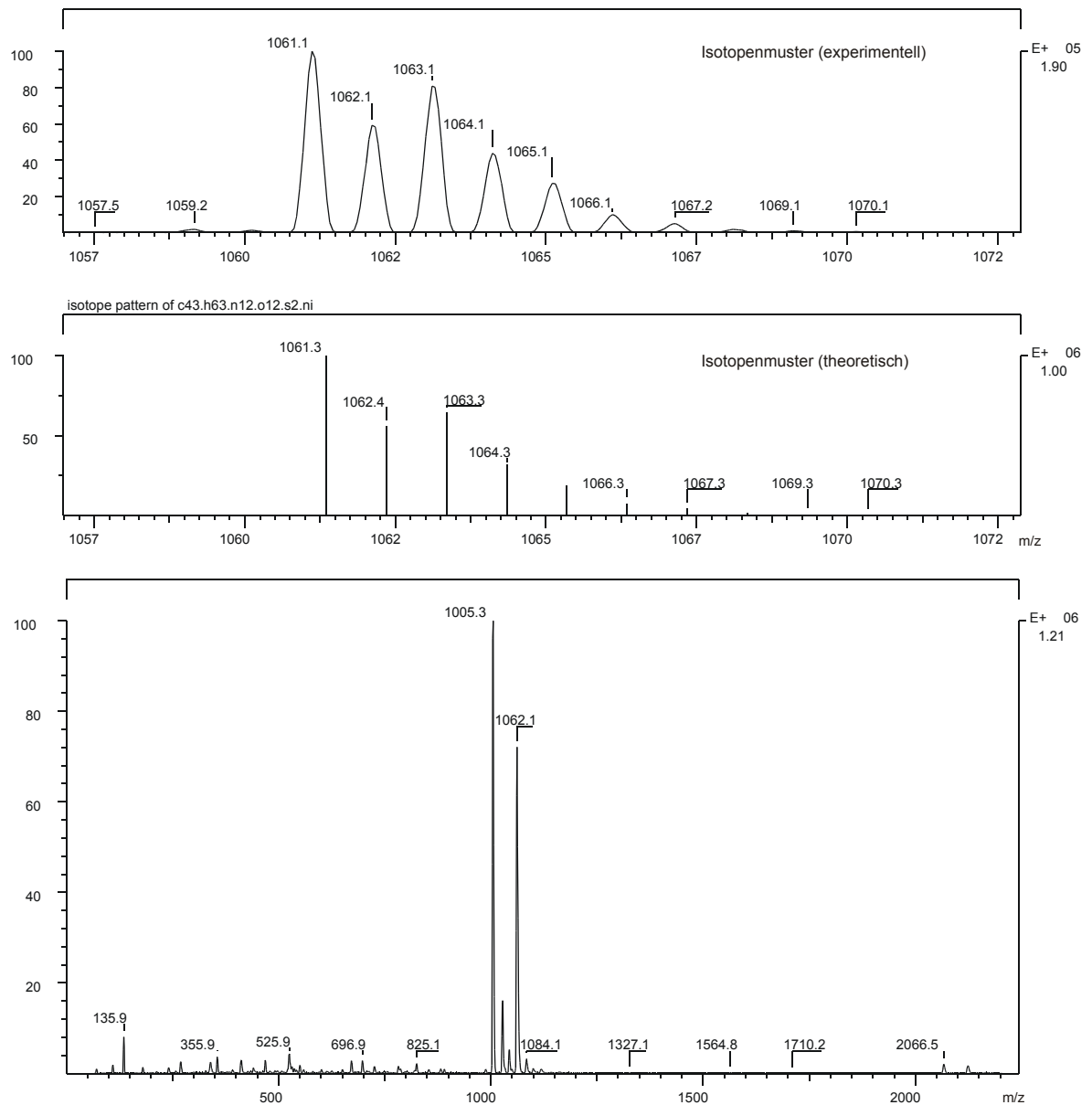


Abbildung 4.2: Bild oben: experimentelles sowie theoretisches Isotopenmuster des Nickels im [1:1] Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes. Bild unten: ESI-Spektrum einer methanolischen Ni^{II}-Nonapeptidlösung mit einem Verhältnis von 1 eq. Ni^{II} zu 1 eq. Nonapeptid

Eine weitere Erklärung wäre die Bildung eines [2:1] Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes. Bei diesem Komplex wäre denkbar, dass neben dem in der Bindungsstelle befindlichen Nickelion, ein zweites Nickelion an der Peripherie des Nonapeptides, zum Beispiel an der Seitenkette des Asp3, koordiniert. Dadurch würde eine Konkurrenz zwischen diesen beiden zwei Bindestellen entstehen, so dass erst bei Nickelüberschuss ausreichend Nickelionen für alle Nonapeptidmoleküle vorhanden sind. Bei der Überführung in die Gasphase würde das an der Peripherie gebundene Nickelion abgestreift und nur ein [1:1]-Komplex wäre nachzuweisen.

4 Komplexierung

Weiterführende ESI-MS Experimente in DMSO und Wasser bzw. wässrigen Phosphatpuffer scheiterten an der Tatsache, dass das Nonapeptid in diesen Lösungen nicht in die Gasphase überführt werden konnte. Daher wurde auf MALDI-TOFL⁵⁵ Experimente ausgewichen. Es wurden Lösungen mit einem Überschuss an Nickelionen vermessen. In Methanol, Wasser wie auch in DMSO wurde stets ein [1:1] Ni^{II}-Nonapeptidkomplex nachgewiesen. Jedoch lagen auch immer beträchtliche Mengen an unkomplexiertem Nonapeptid vor. Auch bei größerem (bis zu 100-fachem) Nickelüberschuss wurde freies Nonapeptid beobachtet. Ebenso wurden kleine Mengen an dimeren Komplexen sowie geringste Mengen an Trimeren nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den ESI-Experimenten wurden hierbei keine Indizien für ein Gleichgewicht erhalten. Eine längere Lagerung der Proben brachte keine eindeutigen Änderungen im Verhältnis von freiem zu komplexiertem Nonapeptid mit sich. Der Grund für den großen Anteil an freiem Nonapeptid könnte in der Meßmethode selbst begründet liegen. Für die MALDI-Experimente wird die Nonapeptidlösung mit einer Matrixlösung auf eine Trägerplatte kokristallisiert und anschließend mittels Laserbeschuss in die Gasphase überführt. Dabei könnten die Metallionen aus ihren Bindungsstellen geschossen werden („metal attrition“). Das Nonapeptid bleibt dabei intakt. Zudem könnte die saure Matrix die Komplexierung ebenfalls stören, da die Thiolgruppen der Cysteine bei der Einlagerung eines Nickelions zuerst deprotoniert werden müssen.

Bei vielen weitergehenden mechanistischen Untersuchungen musste in gepufferten Lösungen (Phosphatpuffer) gearbeitet werden. Bei Pufferkonzentrationen (pH 7,8) von 50 mM kokristallisierte die Probe nicht mit der Matrix auf der Trägerplatte und es konnten keine Massenpeaks erhalten werden. Erst bei einer Pufferkonzentration von 5 mM funktionierte die Kristallisation und es wurden Massenpeaks im Spektrum erkennbar, allerdings war das Signal/Rausch-Verhältnis unbefriedigend. Der basische Phosphatpuffer könnte die Kristallisation mit der sauren Matrix behindert haben.

Eine Analyse dieser extrem schlecht aufgelösten Spektren erlaubte die Identifikation eines Massenpeaks für den [1:1] Ni^{II}-Nonapeptidkomplex sowie größerer Mengen an unkomplexiertem Nonapeptid. Daneben zeigten sich größere Mengen Dimere und auch Trimere. Die Di- und Trimerisierung des Nonapeptides wird vermutlich durch den Phosphatpuffer begünstigt. Förderlich hierfür könnte sich das Messen erst nach mehreren Stunden nach der Herstellung der Lösungen ausgewirkt haben. Durch die basische Umgebung wird die Ausbildung von Disulfidbrücken der Thiolgruppen durch Sauerstoff erleichtert.⁵⁶ Dadurch können sich Dimere und andere Polymere mit der Zeit ausbilden.

4.2 Nickeltitration

Damit genauere Aussagen über das Komplexierungsverhalten getroffen werden konnten, wurde zunächst versucht, das Verhältnis von Nickel(II)-Ionen zu Nonapeptid für eine möglichst vollständige Komplexierung zu ermitteln. Dazu wurde ein abgewandelter Ellman-Test⁵⁷ angewandt⁵⁸.

Wird eine Nonapeptidlösung mit Nickelionen titriert, kann eine Zunahme der Extinktion (E) im UV/Vis-Spektrum bei einer Wellenlänge um 458 nm beobachtet werden. Nach dem Erreichen einer vollständigen Komplexierung bleibt, trotz weiterer Ni^{II}-Zugabe, der Extinktionskoeffizient annähernd konstant. Für dieses Titrationsexperiment wurde eine 1 mM Peptidlösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,8) hergestellt. Schrittweise wurden 10 µl einer 10 mM wässrigen Nickel(II)-Lösung zugegeben, wobei sich die Lösung rotbraun färbte. Die in Abbildung 4.3 illustrierte, schrittweise Zunahme der Extinktion durch die Nickelkomplexierung wurde beobachtet. Die einfachste Erklärung des Befundes wäre das Vorhandensein eines [2:1]-Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes.

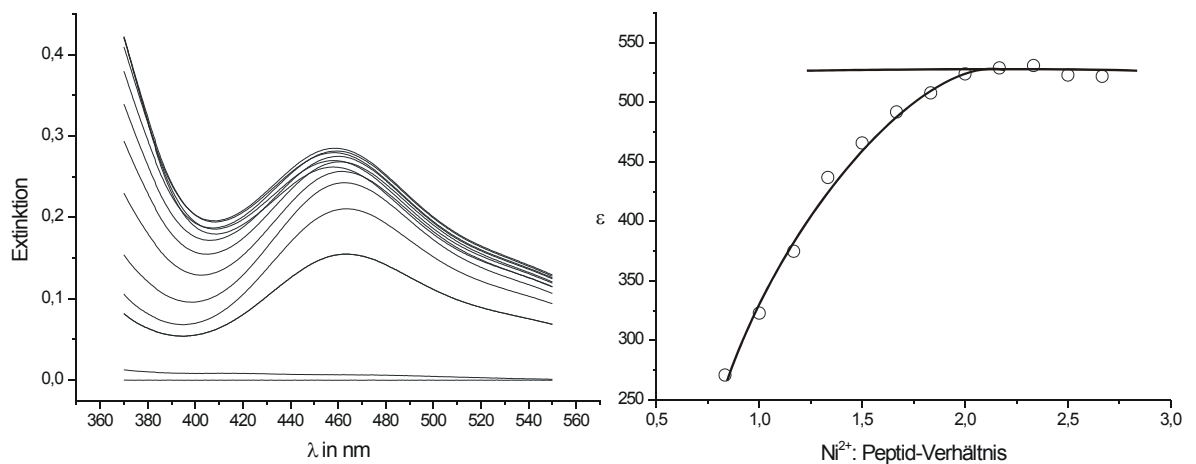


Abbildung 4.3: Links: Wellenlängenscan des Ni^{II}-Komplexes zeigt eine Zunahme der Extinktion mit steigender Ni^{II}-Konzentration ; Rechts: Extinktionskoeffizient bei steigender Ni^{II}-Konzentration

Denkbar wäre ebenfalls das Vorhandensein eines Gleichgewichtes zwischen komplexierten und unkomplexierten Nonapeptid. Um das Gleichgewicht zwischen Nonapeptid und Nickelkomplex vollständig auf die Seite des Komplexes zu verschieben, werden zwei äquivalente Nickelionen pro Nonapeptid benötigt. Zusätzlich könnte die Komplexbildungsgeschwindigkeit auch zu gering sein, so dass mehr Zeit nötig wäre, um eine vollständige Komplexierung zu erreichen. Dem gegenüber steht aber die erhöhte Polymerisierungsgefahr im Phosphatpuffer, die

4 Komplexierung

diesem entgegenwirkt. Auch die schon erwähnte Konkurrenz (Abschnitt 4.1) mit einer zweiten Bindestelle an der Peripherie des Nonapeptides ist nicht auszuschließen. Da bei höheren Nickelkonzentrationen die Pufferlösung trüb wird und Nickelphosphat ausfällt, haben die Phosphationen mit ihrer Konkurrenz um die Nickelionen dadurch eventuell auch Einfluss auf die Komplexbildung vom Nonapeptid mit Ni^{II} .

Die Nickeltitration bei einem ähnlichen Biomimetikum⁵⁸ (bestehend aus den ersten zwölf Aminosäuren des Nickelhakens der NiSOD) zeigte dagegen eine vollständige Komplexierung bei einem [1:1] Verhältnis von Nickelionen zu Biomimetikum an. Da keine Peptidgehaltbestimmung in der Publikation angegeben war, könnte die Einwaage von der tatsächlichen Peptidmenge deutlich abweichen. Ansonsten haben die zusätzlichen drei Aminosäuren aus Asp10-Pro11-Ala12 einen bisher ungeklärten positiven Einfluss auf die Nickelkomplexierung.

4.3 NMR-Spektren des Nickel-Nonapeptidkomplexes

Aufnahmen von Standard ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren einer Nonapeptidlösung mit einem Überschuss an Nickelionen zeigten im Vergleich mit NMR-Spektren einer Nonapeptidlösung ohne Nickelionen kaum Unterschiede (Abb. 4.4 und Abb. 4.5). Spektren von Nonapeptidlösungen mit und ohne Nickelionen glichen sich unabhängig vom Lösungsmittel (DMSO- d_6 oder D_2O). Eine Erklärung wäre, dass das Nickelion gar nicht komplexiert und deshalb keine Änderungen in den Spektren zu verzeichnen sind. Die MS-Ergebnisse widersprechen dem aber, denn dabei wurden, wie bereits erwähnt, stets große Anteile von [1:1]- Ni^{II} -Nonapeptidkomplexe eindeutig nachgewiesen. Eine zu geringe Ni^{II} -Konzentration kann für den fehlenden Unterschied der Spektren auch nicht verantwortlich sein, da die NMR-Messungen mit einem großen Nickelüberschuss vorgenommen wurden. Dieser Effekt weist deutlich auf einen Konformationserhalt des Nonapeptides trotz Ni^{II} -Zugabe hin. Es bildet sich anscheinend spontan eine Vorzugskonformation aus. Dabei könnte für ein Nickelion eine Bindungsstelle vorgeformt werden, in die das Nickelion nur noch hineingehen muss. Dies würde auf eine stabile Ringstruktur des Nonapeptides (ähnlich dem Nickelhaken) in den beiden bekannten Festkörperstrukturen der NiSOD hindeuten.^{14,15}

^1H -NMR-Spektren einer Nickel-Nonapeptidlösung in DMSO- d_6 (aufgenommen nach zwei Tagen Lagerung bei Raumtemperatur), wo wegen dem großen Ni^{II} -Überschuss laut ESI ausschließlich [1:1] Nickel(II)-Nonapeptidkomplexe zu erwarten sind, brachten auch keine Veränderungen im Spektrum mit sich. Nach etwa drei Tagen Lagerung wurden die ersten Zersetzungerscheinungen sichtbar.

Die NMR-Experimente deuten auf die Anwesenheit von diamagnetischen Ni^{II}-Ionen hin. Keine Linienverbreiterung oder Signalverschiebung, wie sie bei paramagnetischen Übergangsmetallen gewöhnlich auftreten, wurden beobachtet.⁵⁹ Elektronenspinresonanz-(ESR)⁶⁰ Experimente unterstützen dies, da keine Signale bei der ESR-Vermessung einer Nickel(II)-Peptidlösung in Phosphatpuffer oder DMSO erhalten werden konnten. Für eine Resonanz bei ESR-Experimenten ist ein paramagnetisches Übergangsmetallion notwendig. Ohne ein Signal kann dieses Experiment auf diamagnetische Nickelionen hinweisen. Dies deutet auf einen quadratisch-planaren Nickelkomplex mit dem Nickelion im Lowspin-Zustand hin, wie er auch im Nickelhaken zu finden ist.

Da sich die Spektren des Nonapeptides gegenüber denen des Komplexes im Wesentlichen nicht unterscheiden, ist überdies die Zuordnung der ¹H- und ¹³C-Signale des Nickel-Nonapeptidkomplexes gegenüber dem Nonapeptid unverändert (Abschnitt 3).

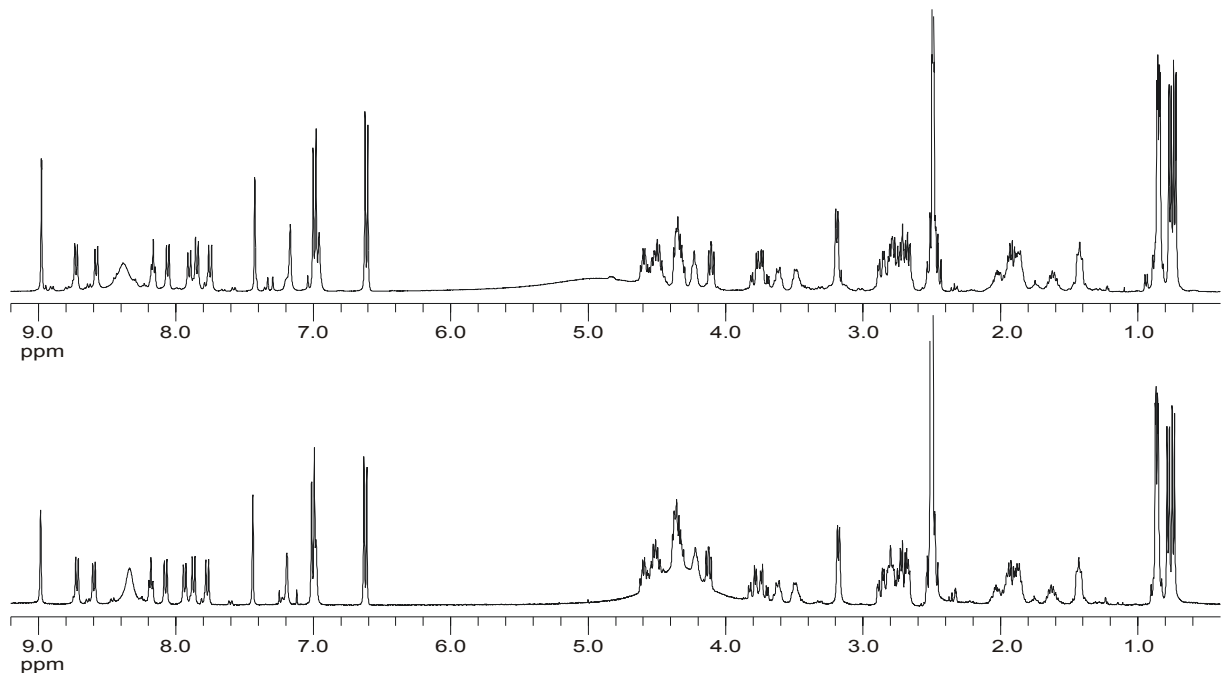


Abbildung 4.4: ¹H-NMR-Spektren des Nonapeptid (unten) sowie des Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes (oben), aufgenommen in DMSO-d₆ bei 25°C

4 Komplexierung

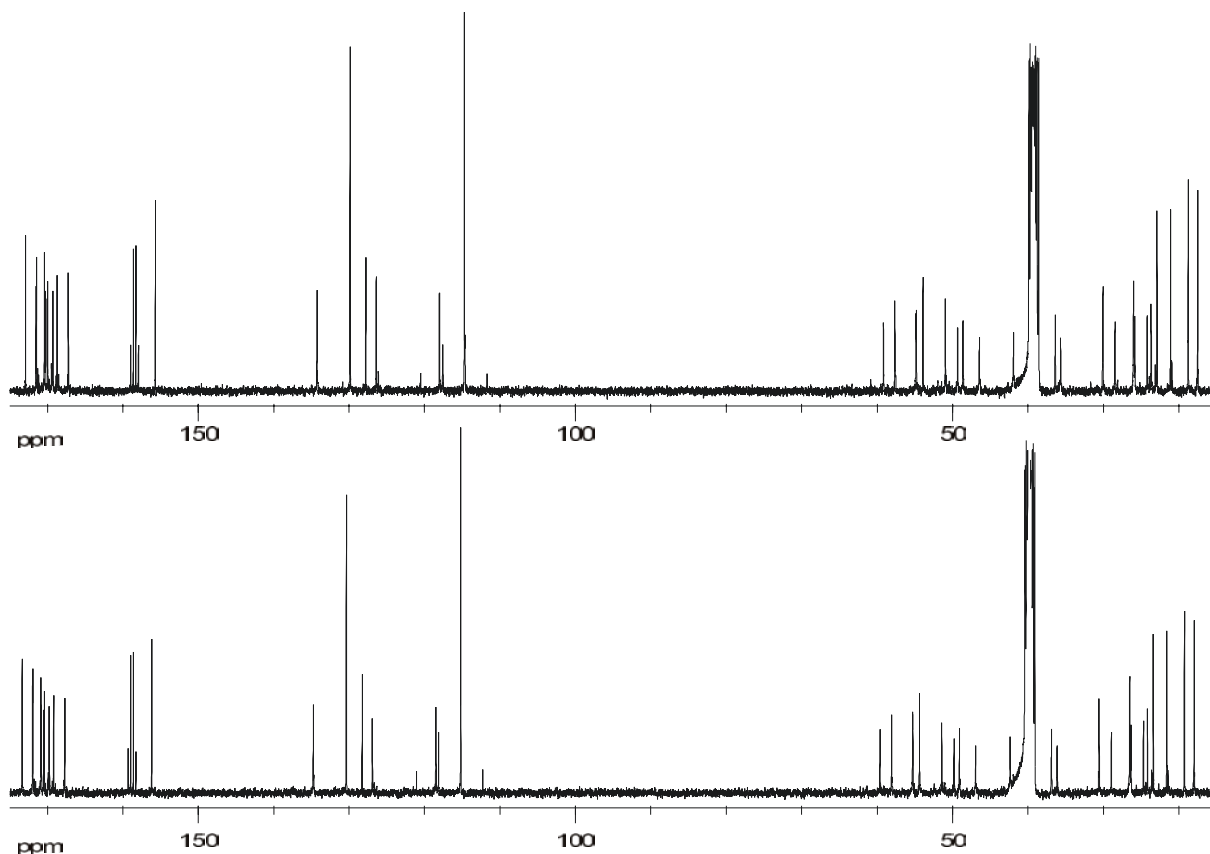


Abbildung 4.5: ^{13}C -NMR-Spektren des Nonapeptides (unten) sowie des Ni^{II} -Nonapeptidkomplexes (oben), aufgenommen in DMSO-d_6 bei 25°C

4.4 Zirkulardichroismus

Die NMR-Experimente zeigten, wie in Abschnitt 4.3 erwähnt, keine Konformationsänderung des Nonapeptides bei Nickelkomplexierung an, daher sollten diese Ergebnisse anhand von Zirkulardichroismus-Spektroskopie⁶¹ überprüft werden.

Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) ist eine Methode mit der die optische Aktivität asymmetrischer Moleküle in Lösung untersucht werden kann. Ein CD-Spektrum macht Angaben darüber, wie zirkular polarisiertes Licht von optisch aktiven Molekülen absorbiert wird. Unterschiedliche Konformationen eines Peptides adsorbieren unterschiedlich. Diese Tatsache wird häufig herangezogen, um Konformationsaussagen in biologischen Systemen zu treffen.⁶¹

Aufgenommene CD-Spektren in Phosphatpuffer (pH 7) vom Nonapeptid im Vergleich mit [2:1] Ni^{II}-Nonapeptidlösungen erbrachten auf den ersten Blick Hinweise auf eine Konformationsänderung (Abbildung 4.6). Die Spektren des unkomplexierten und komplexierten Nonapeptides zeigen sichtliche Unterschiede, die normalerweise auf strukturelle Änderungen hinweisen. Dies würde den NMR-Experimenten, die auf keinerlei Konformationsänderung hinweisen, widersprechen. Vor dieser Interpretation des CD-Spektrums ist jedoch Vorsicht geboten. Falls eine vorgeformte Bindungsstelle für das Nickelion vorliegt, würde dessen Komplexierung ein weiteres optisch aktives Zentrum (das Nickelion selbst) erzeugen. Dies könnte gravierende Änderungen, wie sie beobachtet wurden, im CD-Spektrum mit sich bringen.

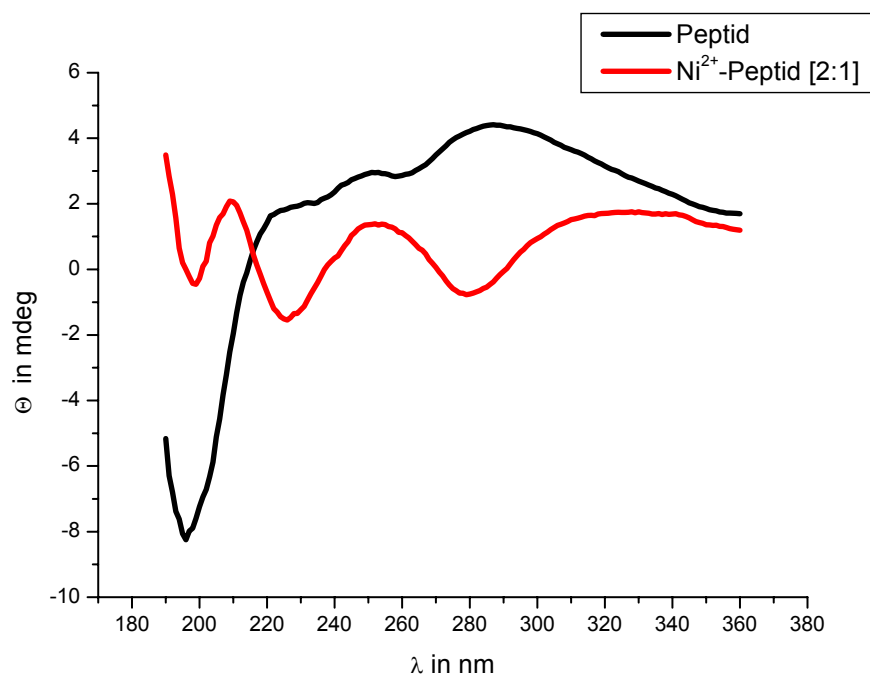


Abbildung 4.6: CD-Spektren (109 – 360 nm) des 0,2 mM Nonapeptides ohne Ni^{II}-Ionen (rot), mit 0,4 mM Ni^{II}-Ionen (schwarz); aufgenommen bei 25°C in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7); die Schichtdicke der Quarzküvette betrug 1 mm

5 Aktivitätsmessungen

5.1 Nachweis einer SOD-Aktivität

Zum ersten Nachweis einer katalytischen Wirksamkeit des Ni^{II} -Nonapeptidkomplexes wurde ein Standardfarbtest für SOD-Aktivität verwendet. Mit diesem Test werden im Gel nach der Elektrophorese die SOD-Enzyme nachgewiesen.⁶² Die Superoxidradikale werden mit einem Riboflavin/TMEDA-System generiert. Sie reagieren mit Nitroblue Tetrazolium (NBT), wodurch sich die Lösung intensiv blauschwarz färbt. Besitzt eine Komponente der Lösung SOD-Aktivität, konkurriert diese mit dem NBT um die Radikale und die Lösung bleibt hell. Ohne SOD-Aktivität färbt sich die Lösung blauschwarz.

Für diese Untersuchung wurde zu einer [1:2] Lösung des Nonapeptides mit Nickel(II)salz in Phosphatpuffer (pH 7,8) der Farbstoff Nitroblue Tetrazolium (NBT) zugegeben. Diese Lösung wurde im Dunkeln 15 min inkubiert. Anschließend wurde ein Riboflavin/TMEDA-Gemisch zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Reaktion durch Licht (Lichttisch) ausgelöst.

Wie in Abbildung 5.1 illustriert, weist eine 1 mM [1:2] Lösung des synthetisierten Nonapeptids und Nickelsalzes eine ausgeprägte SOD-Aktivität auf. Zur Kontrolle wurden Lösungen ohne Nonapeptid und Nickelsalz; nur mit Nonapeptid und nur mit Nickelsalz untersucht. Diese zeigten durch den Farbumschlag die zu erwartende fehlende SOD-Aktivität.

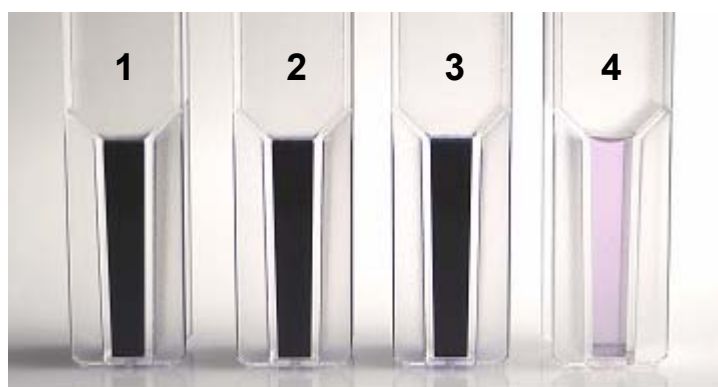


Abbildung 5.1: Nachweis der SOD-Aktivität des Ni^{II} -Nonapeptidkomplexes: 1 Kontrolle; 2 nur Nonapeptid; 3 nur NiCl_2 ; 4 NiCl_2 /Nonapeptid-Gemisch [2:1]

5.2 Untersuchung der SOD-Aktivität

Als Radikalquelle neben dem Riboflavin/TMEDA-System kann auch KO_2 dienen.⁶³ Mit KO_2 ist aber eine Steuerung der Radikalentstehung nur schwer zu erzielen, da es sofort zerfällt, wenn es mit Wasser in Berührung kommt. Daher wurde es nur zur grundsätzlichen Aktivitätsbestimmung, ob vorhanden oder nicht, verwendet.

Zur Überprüfung ob aktiver Nickel-Nonapeptidkomplex auch in reinem Wasser gebildet wird, wurde eine wässrige 0,3 mM Ni-Nonapeptidlösung mit 100 μM NBT hergestellt. Zu dieser Lösung wurde eine geringe Menge $>0,3$ mg KO_2 zugegeben und geschüttelt. Ein Farbumschlag konnte nicht festgestellt werden, was das Vorhandensein einer grundsätzlichen SOD-Aktivität des Ni^{II} -Nonapeptidkomplexes nachweist. Erst nach mehreren zusätzlichen Portionen KO_2 färbte sich die Lösung langsam leicht bläulich.

Kontrolllösungen [eine wässrige NBT-Lösung, sowie eine mit TFA angesäuerte (pH 3-4) wässrige NBT-Lösung] zeigten durch einen sofortigen Farbumschlag die fehlende SOD-Aktivität an. Damit ist die grundsätzliche Ausbildung eines aktiven Ni^{II} -Nonapeptidkomplexes auch in Wasser und unter sauren Bedingungen, wo eine Reprotonierung der Thiolgruppen das Ni^{II} unter Umständen wieder freisetzen könnte, nachgewiesen.

Die Stabilität des Nickel(II)-Nonapeptidkomplexes gegenüber Superoxidradikal-Anionen wurde als nächstes untersucht. Wie in Abschnitt 4 zur Nickeltitration schon erwähnt worden ist, besitzt die Bindung von Nickel mit dem Schwefel des Cysteins eine charakteristische Extinktionszunahme um 458 nm.⁵⁸ Diese Tatsache wurde verwendet, um die Stabilität des Nickel-Nonapeptidkomplexes gegenüber Superoxidradikalen zu überprüfen. Nach Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums einer 1 mM [2:1]-Nickel-Nonapeptidlösung wurden geringe Mengen von KO_2 zugegeben und mehrere Spektren in Abständen von 30 Sekunden aufgenommen. Als nach 60 Sekunden keine Änderungen bei darauf folgenden Spektren mehr auftraten, wurde eine weitere Portion KO_2 zugegeben und weitere Spektren aufgenommen (Abbildung 5.2). Wie im UV/Vis-Spektrum deutlich zu erkennen ist, nimmt die Ni-S Absorption bei 458 sukzessiv ab. Dies deutet auf eine radikalische Zerstörung des Nickel-Nonapeptidkomplexes mit der Zeit hin. Es ist aber ersichtlich, dass der Komplex eine Lebensdauer von mindestens 60 Sekunden in diesem sehr aggressiven Medium besitzt. Es ist noch nicht untersucht worden, ob der Komplex durch Radikale oder die steigende Peroxidkonzentration in der Lösung zerstört wird. Wasserstoffperoxid könnte, unter anderem die Ausbildung von Disulfidbrücken begünstigen und damit die Ni-S-Absorption senken.

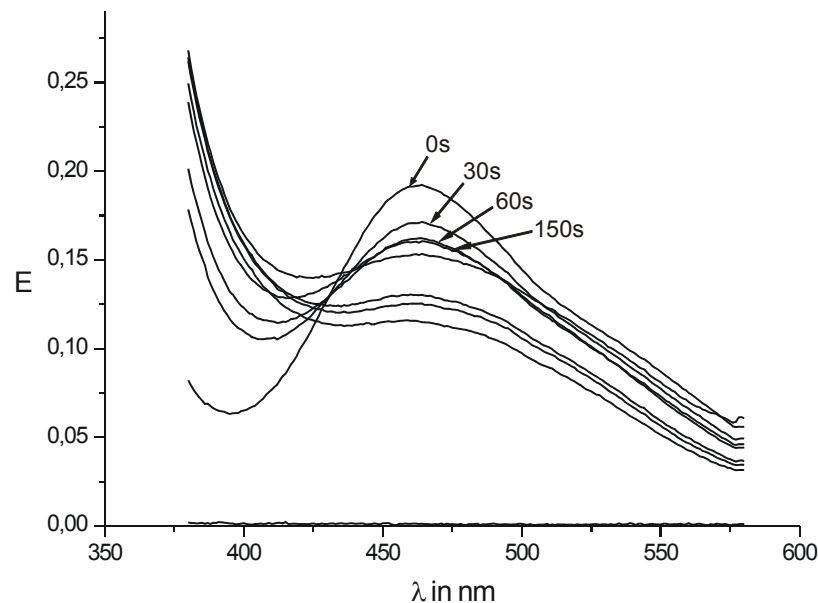


Abbildung 5.2: Zeitliche Änderung im UV/Vis-Spektrum einer 1 mM [2:1]-Ni^{II}-Nonapeptidlösung nach Zugabe geringster Mengen KO₂

5.3 McCord/Fridovich-Test

Mit einem Xanthinoxidase(XOD)/Xanthin-System kann eine gleich bleibende Produktion von Superoxidradikal-Anionen (O₂⁻) in wässrigen Phosphatpufferlösungen gewährleistet werden. Durch Ausnutzung dieser Tatsache wurde erstmals durch McCord und Fridovich ein Testsystem für die quantitative Bestimmung der SOD-Aktivität entwickelt.⁶⁴

Das Enzym Xanthinoxidase oxidiert Xanthin zu Harnsäure. Dabei entstehen gleichmäßig geringe Mengen an O₂⁻ unter „*steady-state*“-Bedingungen. Diese reduzieren Cytochrom C oder NBT, was im UV/Vis-Spektrum bei 550 nm (Cytochrom C) bzw. bei 560 nm (NBT) verfolgt werden kann.^{62,65}

Besitzt eine zugegebene Substanz eine SOD-Aktivität, konkurriert diese mit Cytochrom C bzw. NBT um die Superoxidradikal-Anionen. Dadurch wird die Reduktion des Cytochrom C bzw. NBT inhibiert. Im UV/Vis-Spektrum ist dies durch einen flacheren Anstieg der Extinktion über die Zeit zu erkennen (Abbildung 5.3). Zur Berechnung der Aktivität wird die folgende Formel¹⁷ genutzt, nach der eine Unit als Inhibierung der Reduktion um 50% definiert wird:

$$\text{Aktivität} = \frac{m(\text{Kontrolle}) - m(\text{Probe})}{\frac{m(\text{Kontrolle})}{2}} \quad 5.3.1$$

5 Aktivitätsmessungen

In der Formel wird der Anstieg der Extinktion mit m angegeben. Die Aktivität trägt die Einheit U (Unit). Bezogen auf die Molmenge an SOD-aktiver Substanz in der Testlösung, kann die molare Aktivität ($U/\mu\text{mol}$) bestimmt werden.

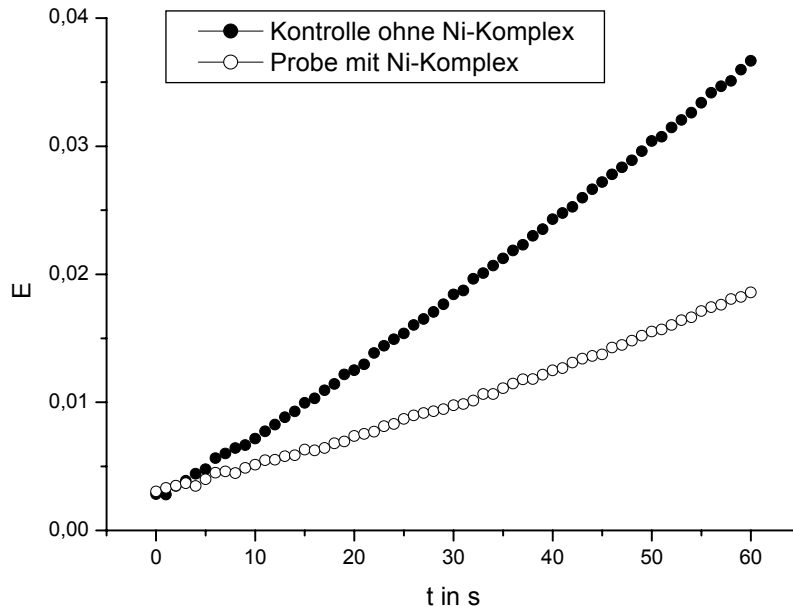


Abbildung 5.3: Graph eines Aktivitätstests, mit der Kontrollgerade und der Gerade mit SOD-Aktivität ($0,34 \mu\text{M}$ Nonapeptid und $0,68 \mu\text{M Ni}^{\text{II}}$) (erkennbar durch flacheren Anstieg) in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) bei Raumtemperatur

Aktivitätsbestimmungen wurden unter gleichen Bedingungen mindestens dreifach bestimmt; eine durchschnittliche Aktivität wird angegeben. Zur Kontrolle wurden Lösungen von Nickelionen bzw. Nonapeptid jeweils für sich gemessen. Weder die Nickelionen noch das Nonapeptid vermochte die Reduktion von Cythochrom C oder NBT zu inhibieren und besitzen demzufolge keine SOD-Aktivität. Eine Ni^{II} -Nonapeptidlösung wies dagegen SOD-Aktivität auf.

Bevor die SOD-Aktivität einer Ni^{II} -Nonapeptidlösung quantifiziert werden konnte, musste die Inhibierung der Oxidation von Xanthin zu Harnsäure ausgeschlossen werden. Dieser Umstand würde falschpositive Messergebnisse liefern. Im UV/Vis-Spektrum bei 290 nm ist die Bildung der Harnsäure durch die Zunahme der Extinktion nachzuweisen.⁶⁶ Um eine Inhibition der XOD-Reaktion durch Nickel, Nonapeptid oder Ni^{II} -Nonapeptidkomplex auszuschließen, wurde ein Ansatz nur mit XOD/Xanthin und einer 0,5 mM Nickel-Nonapeptidlösung bei 290 nm gemessen. Als Kontrolle diente eine XOD/Xanthin-Lösung. Beim Vergleich der Extinktionsanstiege der beiden Messungen wurde kein Unterschied beobachtet. Damit ist eine die Inhibierung der Xanthinoxidation ausgeschlossen.

Quantitative Messungen der Aktivität unter Verwendung von Cytochrom C sowie NBT zeigten, dass die Verwendung von Cytochrom C durchwegs kleinere Aktivitäten als NBT lieferte. Zudem zeigten sich bei unterschiedlichen Cytochrom C-Quellen (*equine* oder *Saccharomyces cerevisiae*) Abweichungen in der XOD-Aktivität und auch SOD-Aktivität. Hierfür ist kein Grund bekannt. Zudem wird in der Literatur berichtet, dass SOD-Biomimetika auf Basis kleiner Eisen- oder Mangan-Komplexe falsche Resultate bei der Verwendung von Cytochrom C lieferten.⁶⁷ Solche Metallkomplexe sind in der Lage, die Oxidation von Cytochrom C durch generiertes Wasserstoffperoxid zu katalysieren. Eine Tatsache, die zu einer scheinbar erhöhten SOD-Aktivität führt. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass der hier untersuchte Ni^{II}-Nonapeptidkomplex nicht ebenfalls ein solches Verhalten gegenüber Cytochrom C aufweist, wurde NBT bei allen weiteren quantitativen Bestimmungen der Aktivität verwendet.

Bei den Messungen mit NBT fiel zunächst auf, dass die Aktivität des Komplexes nach längeren Messzeiten abnimmt. Dies wird ersichtlich durch einen immer größer werdenden Anstieg der Extinktion der Probe (Abbildung 5.4). Wie in Kapitel 5.2 beschrieben wurde, wird der Nickelkomplex mit der Zeit von O₂⁻ zerstört. Dies wäre eine Erklärung für die beobachtete langsame Abnahme der Aktivität, resultierend aus der allmählichen radikalischen Zerstörung des Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes. Dies sorgt dafür, dass bei geringen Ni^{II}-Komplekonzentrationen (etwa unter 1 µM) der Anstieg nur noch in den ersten 30 bis 60 Sekunden annähernd linear ist, danach wird er immer steiler und verändert dadurch die Ergebnisse.

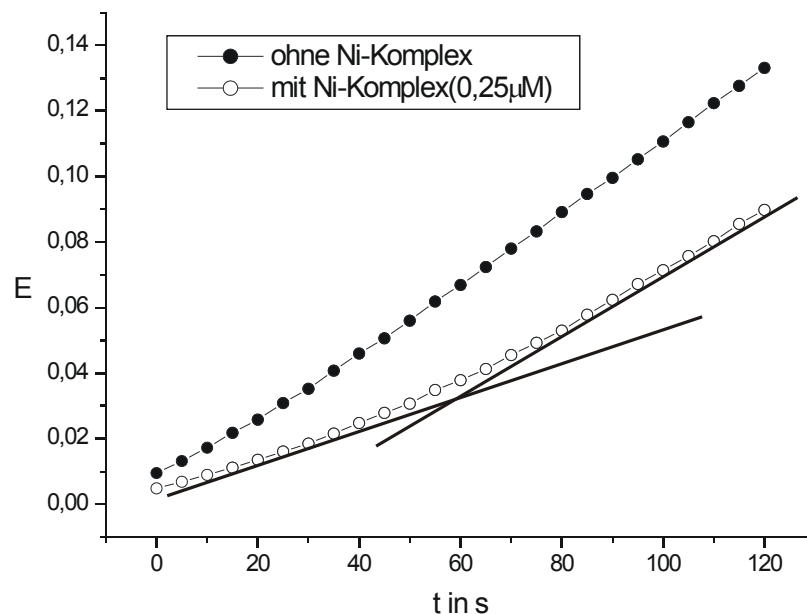


Abbildung 5.4: Zunahme des Anstieges mit der Zeit bei Aktivitätsmessung einer Probe mit geringer Ni^{II}-Komplekonzentration in 50mM Phosphatpuffer (pH 7,8) bei Raumtemperatur

5 Aktivitätsmessungen

Bei Arbeiten im substratlimitierten Bereich ist ein deutlicher Überschuss an aktiven Komplexen vorhanden. Daher ist eine zeitliche Verzögerung dieses Effektes (Abnahme der Aktivität erst nach langen Messzeiten) durchaus verständlich. Für weitere Bestimmungen der Aktivität wurde stets der lineare Anstieg während der ersten 60 Sekunden verwendet.

Eine weitere Möglichkeit für die Aktivitätsabnahme wäre allerdings die Komplexierung von $O_2^{\cdot-}$, aber einer fehlenden anschließenden Umsetzung zu Wasserstoffperoxid. Der McCord-Fridovich-Test weist nur indirekt eine SOD-Aktivität nach und nicht die direkte Bildung von Wasserstoffperoxid. Ein direkter Nachweis der Wasserstoffperoxidbildung als Konsequenz einer SOD-Aktivität ist jedoch schwierig, da Standard-Tests (zum Beispiel Fox-Test⁶⁸) zum Wasserstoffperoxidnachweis auch für $O_2^{\cdot-}$ ein positives Ergebnis liefern. Aufgrund der hohen Aktivität des Ni^{II} -Komplexes scheint jedoch eine katalytische Umsetzung gewährleistet zu sein. Um die katalytische Umsetzung (*turnover*) direkt bestimmen zu können, ist jedoch eine direkte Messmethode wie z.B. Pulsradiolyse⁶⁹ oder die Stopped-Flow-Methode⁷⁰ notwendig, wobei der Umsatz von Radikalen oder die Entstehung von Wasserstoffperoxid direkt beobachtet werden kann.

Die bisher erläuterten Experimente weisen eine grundlegende SOD-Aktivität für den Nickel-Nonapeptidkomplex nach. Nebenreaktionen und anderweitige Effekte, welche eventuell falschpositive Aktivitätstestergebnisse erzeugen würden, konnten weitestgehend ausgeschlossen werden.

5.4 Quantifizierung der SOD-Aktivität

Für die ersten quantitativen Messungen wurden Nonapeptidkonzentrationen gewählt, bei denen ein möglichst langer linearer Anstieg zu messen war. Die ersten Messungen im Bereich von etwa 2 bis 4 μM zeigten, dass die SOD-Aktivität des Biomimetikums von der XOD-Aktivität abhängt. Wird die Konzentration von XOD/Xanthin erhöht, steigt die molare Aktivität bei gleich bleibender Konzentration des Biomimetikums an. Dies weist auf Reaktionen im substratlimitierten Bereich hin. Das XOD/Xanthinsystem produziert nur geringe Mengen Superoxidradikal-Anionen. Die Menge ist nicht ausreichend, um eine maximale Umsatzrate durch das Biomimetikum zu erzielen. Unter diesen Bedingungen gemessenen Aktivitäten können daher als untere Grenzwerte betrachtet werden. Um vergleichbare Ergebnisse in diesem Messbereich erhalten zu können, war es notwendig mit stets gleicher XOD-Aktivität zu messen. Dies wurde erzielt, indem nur Aktivitäten miteinander verglichen wurden, die am gleichen Tag mit den gleichen Lösungen gemessen wurden.

Bei der höchsten vermessenen Nonapeptidkonzentration von $3,4 \mu\text{M}$ im Messansatz mit einem Nickelionenüberschuss ergab sich eine molare SOD-Aktivität von nur etwa $340 \text{ Units}/\mu\text{mol}$. Die Inhibierung der NBT-Reduktion war dabei zwar sehr hoch (80%), aber die molare Aktivität noch sehr gering. Durch die Verringerung der Nonapeptidkonzentration wurde versucht, einen Kompromiss zwischen hoher Aktivität und sicheren Messergebnissen durch einen stetig linearen Anstieg zu finden. Bei einer Peptidkonzentration von $0,7 \mu\text{M}$ schien dies gegeben zu sein.

Bei dieser Konzentration lag eine SOD-Aktivität von etwa $800 \text{ Units}/\mu\text{mol}$ bei einem Verhältnis von einem äquivalent Nickelionen pro Nonapeptid vor. Da Nickelionen allein keine SOD-Aktivität aufweisen, ist von einer unvollständigen Nickel-Nonapeptidkomplexbildung auszugehen. Im Abschnitt 4 (Ni-Komplexierung) wurde schon erwähnt, dass etwa eine doppelte Menge von Nickelionen pro Nonapeptid vorliegen muss, um eine vollständige Komplexierung zu gewährleisten. Dies wurde nun mittels Aktivitätsuntersuchungen anhand dieses Testsystems untersucht. Dabei wurden Aktivitätsmessungen bei gleich bleibender Nonapeptidkonzentration ($0,7 \mu\text{M}$), aber unterschiedlicher Ni^{II} -Konzentration durchgeführt (Abbildung 5.5).

Mit ansteigender Nickelkonzentration stieg auch die Aktivität bis zu einem Maximum von etwa $1250 \text{ Units}/\mu\text{mol}$. Auch bei diesen Messungen bestätigten sich die vorherigen Ergebnisse, dass pro Mol Nonapeptid etwa zwei Mol Nickelsalz notwendig sind, um eine vollständige Komplexierung des Nonapeptides mit Nickelionen zu erhalten.

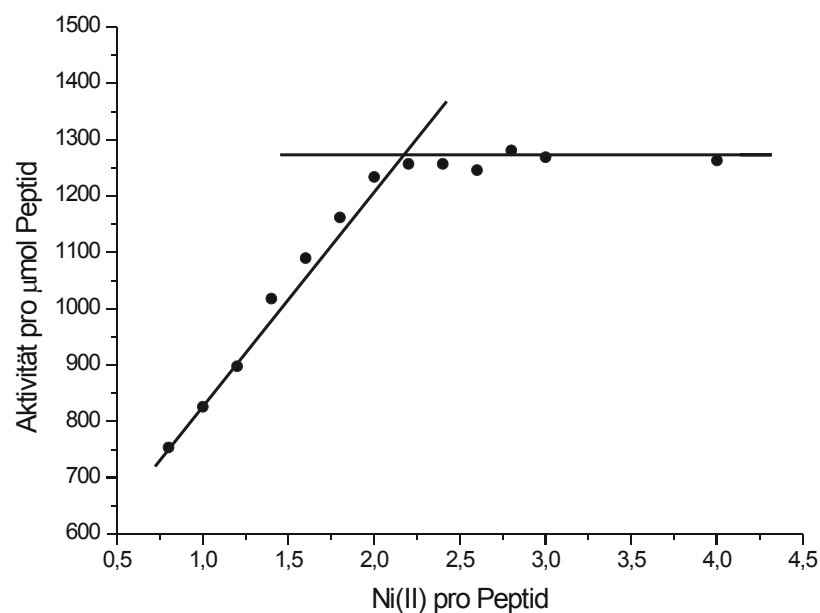


Abbildung 5.5: Einfluss der Ni^{II} -Konzentration auf die SOD-Aktivität des Biomimetikums (im substratlimitierten Bereich)

5 Aktivitätsmessungen

Die maximale molare SOD-Aktivität des Nickelkomplexes ist damit noch nicht erreicht. Daher wurde zur weiteren Untersuchung die molare Aktivität bei fallender Nickel-Nonapeptidkonzentration bestimmt (Abbildung 5.6).

Die maximale molare Aktivität wird erst unter nicht substratlimitierten Bedingungen erhalten. Hierfür wurde auch mit einem Überschuss von zwei äquivalenten Nickelionen pro Nonapeptid gearbeitet. Durch die Verringerung der Nonapeptidkonzentration erhöhten sich die Probleme durch die Zerstörung des Ni^{II} -Komplexes mittels Radikalanionen. Der lineare Bereich des Anstiegs verkürzte sich immer mehr und erhöhte damit den Fehler. Die molare Aktivität stieg aber exponentiell an, so dass die vergrößerten Messfehler nicht allzu sehr ins Gewicht fielen. Die molare Aktivität stieg bis zu einer Konzentration des Nonapeptides von $0,34 \mu\text{M}$ an. Unterhalb dieser Konzentration blieb die Aktivität im Fehlerbereich bei einem Höchstwert von ca. $2200 \text{ U}/\mu\text{mol}$ annähernd konstant.

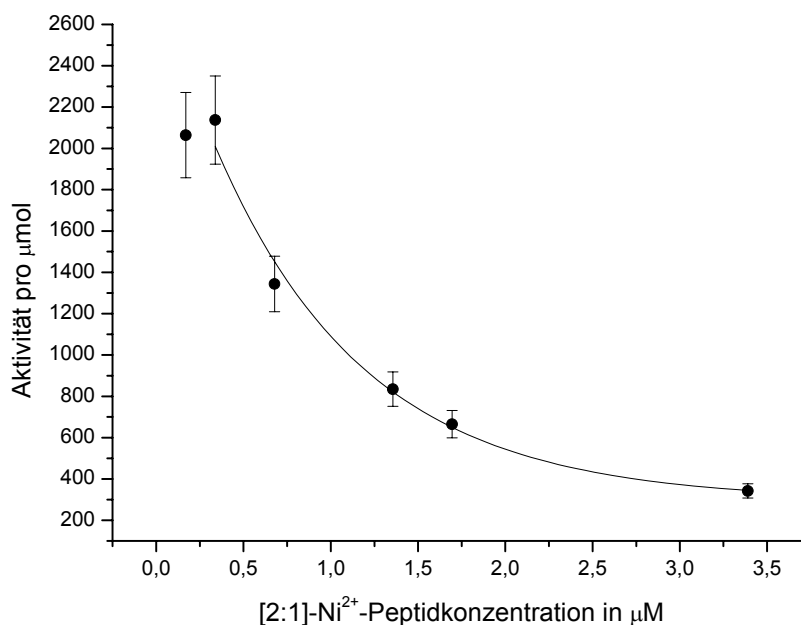


Abbildung 5.6: Extrapolierung der molaren SOD-Aktivität einer [2:1] Ni^{II} -Nonapeptidkomplexes gegen Null (maximale Aktivität)

Einige Einflüsse, die die maximale Aktivität senken würden, konnten noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine Hauptursache für eine verringerte Aktivität könnte die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken der Cysteine oder auch Disulfidbrücken zwischen den Nonapeptiden im Phosphatpuffer sein. Da es nicht möglich war, unter anaeroben Bedingungen (Argonatmosphäre) die Messungen durchzuführen, ist die Bildung von Disulfidbrücken im leicht basischen Milieu durch Luftsauerstoff begünstigt.⁵⁶ Die Verwendung von reduktiven Substanzen könnte dies zwar verhindern, aber auch einen unbekanntem Einfluss

auf die enzymatische Reaktion bei der Messung haben. Bisher zeigten Messungen, bei denen der Ni^{II}-Nonapeptidkomplex in Wasser hergestellt wurde, keine signifikanten Unterschiede zu dem in Phosphatpuffer angesetzten Komplex.

Letztlich ergaben die quantitativen Aktivitätsmessungen mit diesem Testsystem eine maximale molare Aktivität von etwa 2200 U/ μ mol mit einem Messfehler von $\pm 10\%$. Des Weiteren wurde ein IC₅₀-Wert von 0,33 μ M ermittelt. Der IC₅₀-Wert ist die Konzentration des Inhibitors (Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes), bei der die NBT-Reduktion um 50% gehemmt wird.

Zum Vergleich dieses Biomimetikums mit der nativen NiSOD wurden experimentelle Ergebnisse an *S. griesus*¹⁷ herangezogen. Aktivitätsmessungen ergaben bei dieser NiSOD eine spezifische Aktivität von 3315 U/mg. Mit einer Molmasse von 13,4 kDa der sechs NiSOD-Untereinheit lässt sich eine molare SOD-Aktivität von etwa 44500 U/ μ mol pro Untereinheit für das Enzym errechnen. Es ist bei dieser etwas älteren Arbeit jedoch zu vermuten, dass die NiSOD mit geringen Mengen an FeSOD verunreinigt sein könnte, was zu dieser erstaunlich hohen Aktivität führt.

Zum Vergleich dieses Biomimetikums mit aufgereinigter nativer NiSOD aus *S. acidiscabies* wurden SOD-Aktivitätsmessungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Kothe. durchgeführt. Die gemessene molare Aktivität von NiSOD beträgt dabei 10700 U/ μ mol pro Untereinheit des Enzyms. Die maximale molare Aktivität des Biomimetikums ist mit etwa 2200 U/ μ mol um einiges geringer, obwohl das NiSOD-Enzym im Gegensatz zum Biomimetikum stark reguliert wird.⁷¹

Der IC₅₀-Wert kann mit einem ähnlichen Biomimetikum⁷² der NiSOD, bei dem statt neun Aminosäuren des Nickelhakens zwölf übernommen wurden, verglichen werden. Bei dem Dodecapeptid wurde ein IC₅₀-Wert von 0,2 μ M ermittelt. Damit liegt er im Bereich den Nonapeptides mit 0,33 μ M.

6 3D-Struktur in Lösung

6.1 2D-[¹H,¹H]-ROESY-Spektren

Standard ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren des Nonapeptides weisen, wie bereits in Abschnitt 3 diskutiert, außergewöhnlich scharfe Signale auf. Dieser Befund, zusammen mit der sehr ungewöhnlichen Thermostabilität der spektralen Signale im Bereich von 25 bis 80°C in DMSO aufgenommenener ¹H-Spektren (Abbildung 3.4), könnte auf das Vorhandensein einer Vorzugskonformation hinweisen. Als weitere Möglichkeit könnte eine sehr hohe Beweglichkeit des Nonapeptides und damit einhergehender fehlender struktureller Einheit die scharfen Signale erklären. Um diesen Möglichkeiten nachzugehen, wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Görlach (Leibniz-Institut für Altersforschung) 2D-NMR-Experimente zur Aufklärung der 3D-Struktur in Lösung durchgeführt.

Zur Strukturaufklärung des Nonapeptides wurden [¹H,¹H]-ROESY-Experimente⁷³ in Wasser durchgeführt (ROESY: **RO**tating frame nuclear Overhauser **E**ffekt **S**pectroscop**Y**). Die ROE-Spektroskopie ist ein abgewandeltes NOE-Experiment.

NOE-Experimente⁷³ nutzen den Mechanismus der dipolaren Kopplung. Dies ist die Wechselwirkung des magnetischen Moments zweier Spins durch den Raum (Nuklearer-Overhauser-Effekt). Dabei wird der Spin eines Wasserstoffkerns polarisiert und in einer darauf folgenden Mischzeit findet ein Polarisationstransfer über den Raum zwischen dipolar koppelnden Protonen statt. Diese magnetischen Wechselwirkungen zwischen den Kernen erzeugen Kreuzsignale in einem 2D-NOE-Experiment. Diese Kreuzsignale zeigen qualitativ Wasserstoffe an, die im Molekül räumlich benachbart sind. Da der Nukleare-Overhauser-Effekt mit $1/r^6$ (r = Abstand zwischen den koppelnden Protonen) abnimmt, können nur Abstände unterhalb ca. 6 Å nachgewiesen werden. Durch die räumlichen Beziehungen dieser Wasserstoffatome, besonders von solchen, die über viele chemische Bindungen getrennt sind, können Informationen zur 3D-Struktur komplexer biologischer Moleküle gewonnen werden.

Hierzu werden die Kreuzsignale integriert oder qualitativ in Abstandbereiche eingeteilt. Da z.B. das Rauschen im Spektrum die Integrale der Kreuzsignale verfälschen kann, können oft keine exakten Abstände bestimmt werden. Daher werden im Allgemeinen anhand der Intensität der Kreuzsignale Abstandsbereiche mit den oberen Grenzen von 2,8; 3,6 bzw. 5,5 Å zugeordnet.

Die Effizienz des NOE-Transfers (und damit die Intensität des Kreuzsignals) ist durch die Kreuzkorrelationsrate σ gegeben. Diese setzt sich zusammen aus der Differenz des dipolaren Doppelquantenübergang [W_2 -Übergang mit simultanen

Spin-Flip beider Spins in dieselbe Richtung] zu dem Nullquantenübergang [W_0 -Übergang mit simultanen Spin-Flip der Spins in entgegengesetzte Richtungen]:

$$\sigma = W_2 - W_0 \quad 6.1.1$$

Bei kleinen Molekülen überwiegt der Doppelquantenübergang (W_2) und der NOE-Effekt ist positiv. Bei großen Molekülen überwiegt dagegen der Nullquantenübergang (W_0) und der NOE-Effekt ist dementsprechend negativ.

Dazwischen liegt für mittelgroße Moleküle ein kritischer Bereich, bei dem der Doppelquantenübergang annähernd gleich dem Nullquantenübergang ist. In diesem Bereich tendieren die Kreuzsignale gegen Null. Das Experiment hat gezeigt, dass diese problematische Region bei einer Molmasse zwischen 1000 bis 3000 g/mol liegt.⁵³ Standard-2D-NOE-Experimente eignen sich für das hier untersuchte Biomimetikum (Molmasse des Nonapeptides 1005 g/mol) daher nicht. Um dieses Problem generell zu umgehen, wird daher die abgewandelte Form des NOE-Experiments, das [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-ROESY-Experiment verwendet.

Im Gegensatz zum NOE-Effekt ist der ROE-Effekt (**R**otating **O**verhauser **E**ffekt) stets positiv. Dies wird erreicht, indem mit Hilfe eines Spinlock-Feldes die Magnetisierung „geloct“ wird. Dadurch können räumliche Wasserstoffabstände für Moleküle im problematischen Bereich, wie z.B. bei dem hier untersuchtem Nonapeptid gewonnen werden.

Die [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-ROESY-Spektren einer wässrigen 1 mM Nonapeptidlösung (in 90% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ bzw. 100% D_2O) wurden bei Raumtemperatur mit Mischzeiten von 50, 150 und 200 ms aufgenommen. Ein Beispiel des kompletten 2D- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-Spektrums ist im Anhang (Abbildung A.7) zu finden. Die für das Nonapeptid ermittelten Resonanzen wurden mit Hilfe weiterer 2D-NMR-Experimente (DQF-COSY und TOCSY) zugeordnet.

Neben der Bestimmung der 3D-Raumstruktur können die Kreuzsignale zur Überprüfung der Peptidsequenz dienen. Durch die Kopplung der Rückgratprotonen der Peptidbindungen (vom Stickstoffproton $\text{H}^{\text{N}1}$ zum C^α -Proton $\text{H}^{\alpha 1}$ der jeweiligen Aminosäure und vom $\text{H}^{\alpha 1}$ zum $\text{H}^{\text{N}2}$ der darauf folgenden Aminosäure) kann die Peptidsequenz verfolgt werden. In Abbildung 6.1 ist die korrespondierende $\text{H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha$ -Region des Nonapeptids abgebildet. Die H^α -Resonanz des Asparaginsäurerestes (Asp3) wurde vom Wassersignal verdeckt. Ein [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-ROESY-Spektrum in 100% D_2O wurde daraufhin aufgenommen, um diese Resonanz zu lokalisieren. Die H^{N} -Resonanzen der N-terminalen NH_2 -Gruppe waren nicht sichtbar, aber das H^α des His1 und dessen Kopplung zum H^{N} des Cys2 wurde beobachtet. Weiterführend konnten alle korrespondierenden H^α - H^{N} Paare im so genannten „*sequential walk*“ gefunden werden. Beim Prolin5 entsteht eine Lücke, da es aufgrund seiner Struktur (Iminosäure) keine H^{N} besitzt.

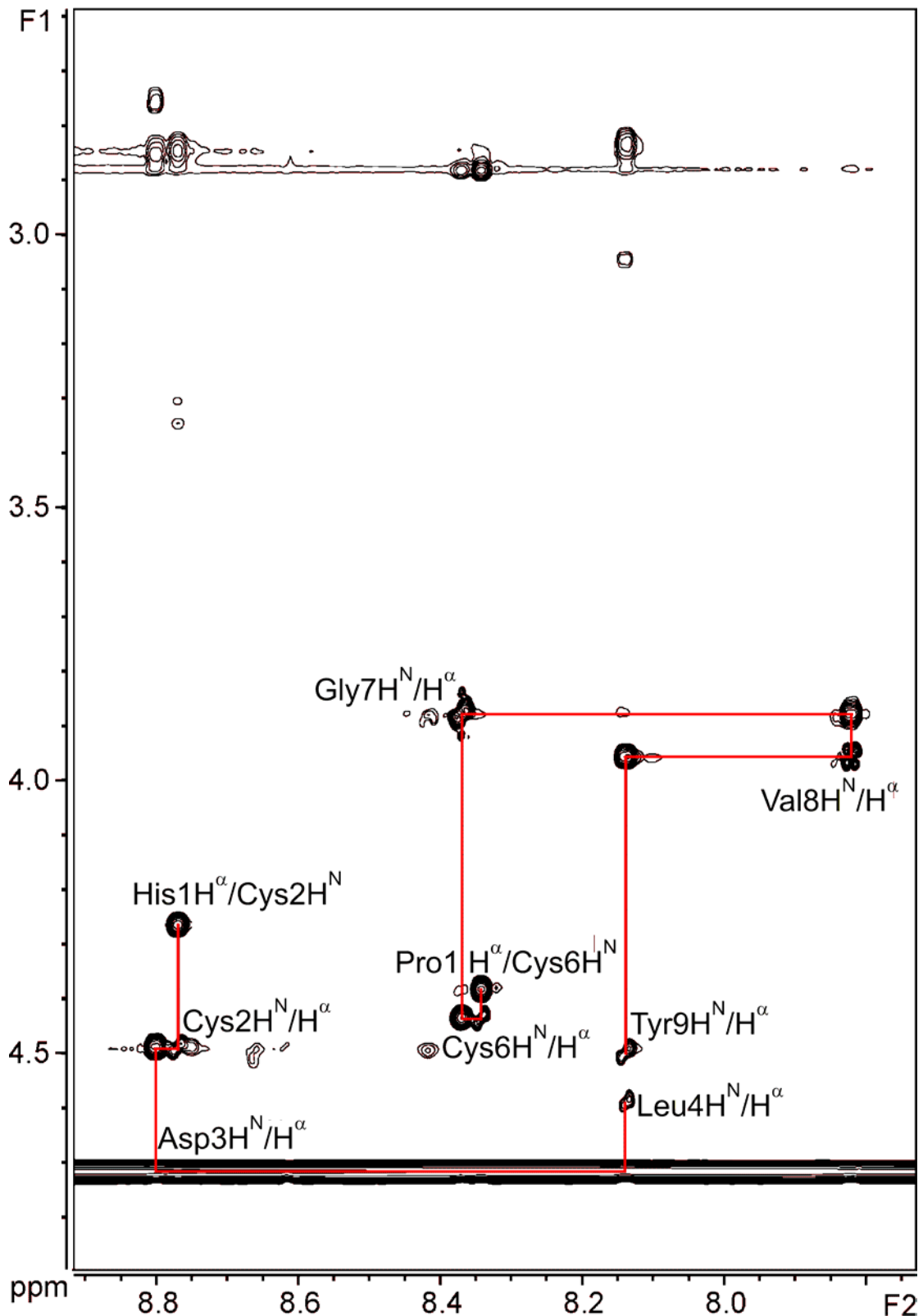


Abbildung 6.1: Ausschnitt des $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -ROESY-Spektrums mit den korrespondierenden $\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}$ -Kreuzsignalen der Rückgratsequenz des Nonapeptids; Pro5 fehlt, da es kein H^{α} besitzt

Ein Prolinrest in einer Peptidkette kann grundsätzlich zwei Konformationen *cis* und *trans* (Abbildung 6.2) einnehmen. Der Energieunterschied zwischen diesen beiden Konformationen ist für gewöhnlich sehr gering.⁷⁴ Die Wechselwirkungen benachbarter Gruppen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) sind normalerweise ausschlaggebend für die Einstellung der jeweiligen (*cis/trans*) Konformation. In der Festkörperstruktur der NiSOD weist Pro5 ausschließlich eine *cis*-Konformation auf.⁷⁵

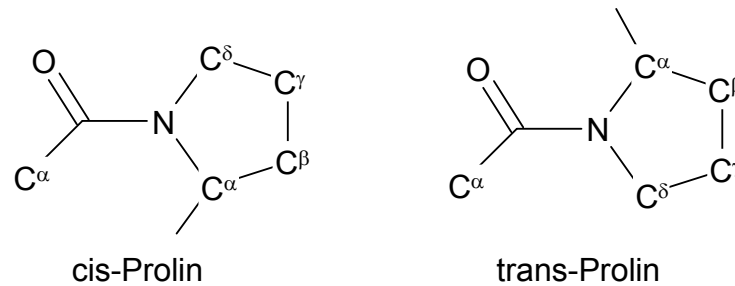


Abbildung 6.2: Konformation des *cis*- bzw. *trans*-Prolins

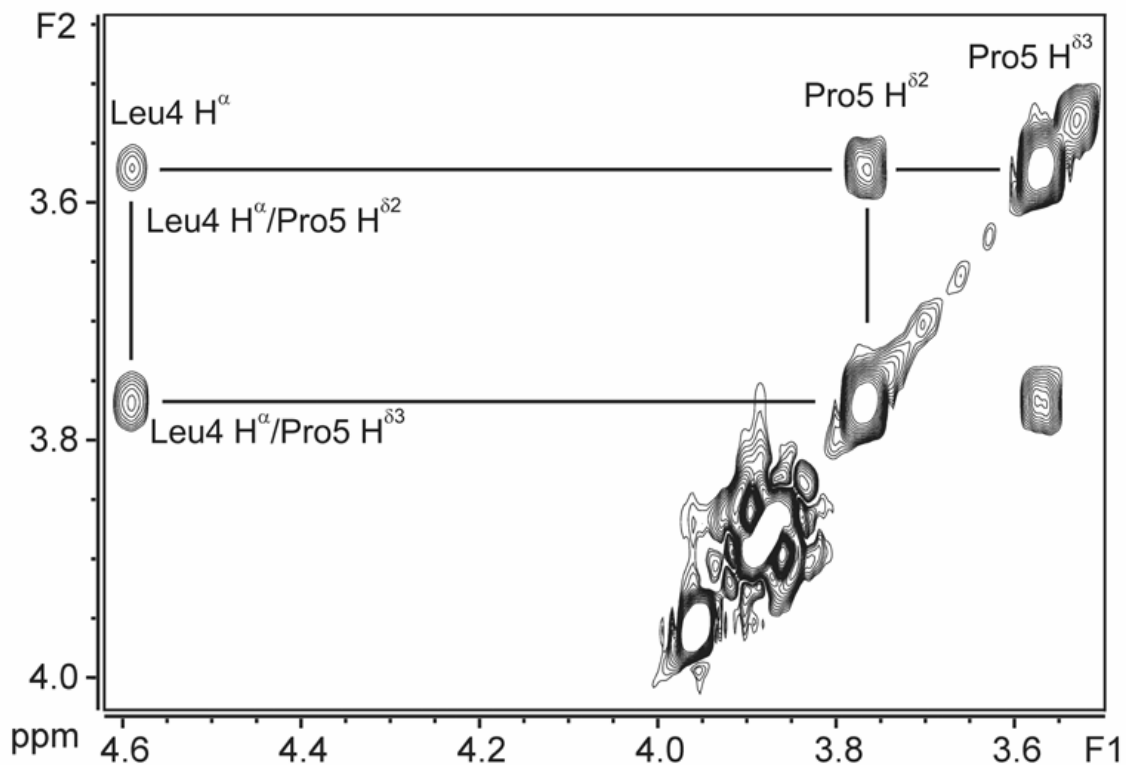


Abbildung 6.3: Ausschnitt des [¹H,¹H]-ROESY-Spektrum des Nonapeptids mit typischen H^{α*i-1*} zu H^δ-Kreuzsignalen einer *trans*-Verknüpfung des Pro5 im Nonapeptid

Das [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-ROESY-Spektrum des Nonapeptides (Abbildung 6.3) weist typische $\text{H}^{\alpha}_{i-1}-\text{H}^{\delta}$ Kreuzsignale von H^{α} des Leu4 mit den beiden $\text{H}^{\delta 2}$ - und $\text{H}^{\delta 3}$ -Protonen des Pro5 auf, welche auf das Vorhandensein einer *trans*-Konformation für die Peptidbindung schließen lässt. Im Fall einer *cis*-Konformation würde H^{α} von Leu4 mit dem H^{α} des Pro5 koppeln. Keinerlei Hinweis auf eine solche Kopplung ist im [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-ROESY-Spektrum zu finden, worauf auf eine ausschließliche *trans*-Konformation des Pro5 im Nonapeptid geschlossen wird.

6.2 2D-Konformationsvielfalt des Nonapeptidpeptids

Die Qualität der aufgenommenen [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-ROESY-Spektren des Nonapeptides erlaubt eine eindeutige Zuordnung, einschließlich der Abstandsbereiche der Kreuzsignale aller wechselwirkenden Protonen. Es wurden 31 Kreuzsignale ermittelt. Deren zugeordnete obere Abstandsbeschränkungen sind in Tabelle 6.1 aufgelistet. Einige Kreuzsignale stammen von Protonen, die sich in schnell rotierenden Gruppen befinden, wie zum Beispiel die Methylgruppen in der Seitenkette des Valins (Val8). Diese Rotation lässt keine genauere Unterscheidung der einzelnen Protonen der Gruppe zu. Daher wird ein geometrischer Mittelwert aus diesen Protonen bestimmt. Dieser wird als Pseudoatom Q in Tabelle 6.1 angegeben. Durch die Zusammenfassung mehrerer Protonen musste der Abstandsbereich entsprechend korrigiert werden. Abbildung 6.4 weist auf die für diese Zuordnung verwendete Bezeichnung der Atome in den einzelnen Aminosäuren des Nonapeptides hin.

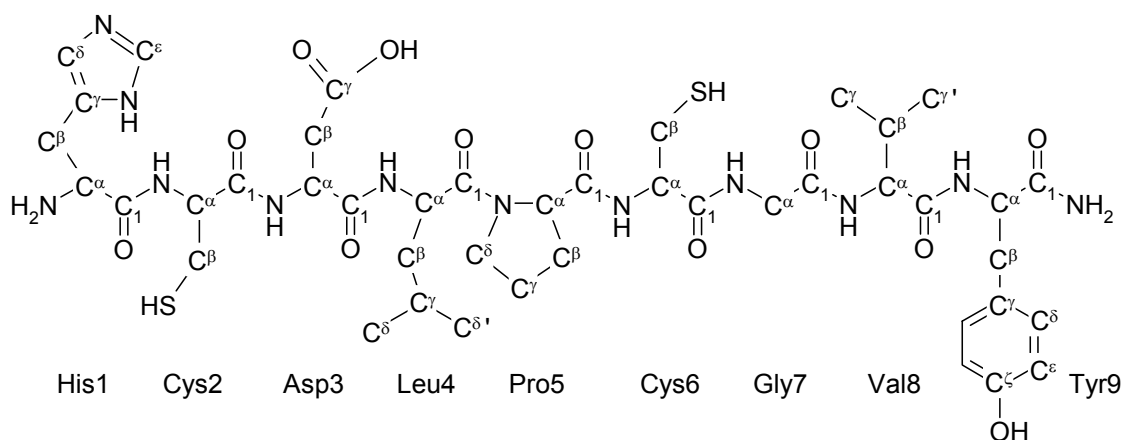


Abbildung 6.4: Die für die Zuordnung der Kreuzsignale in [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-ROESY-Spektrum verwendete Bezeichnungen der Atome in den einzelnen Aminosäuren des Nonapeptids

Tabelle 6.1: Kreuzsignale im [$^1\text{H}, ^1\text{H}$]-ROESY-Spektrum des Nonapeptids mit den zugehörigen oberen Abstandsbeschränkungen

Kreuzsignal	Proton(en)	Koppelnde Proton(en)	Abstand (Å)
1	1 HIS H $^{\delta 2}$	9 TYR H N	5,50
2	1 HIS H $^{\delta 2}$	9 TYR H $^{\alpha}$	5,50
3	2 CYS H $^{\beta 2}$	3 ASP H N	5,50
4	2 CYS H $^{\beta 2}$	4 LEU H N	5,50
5	2 CYS H $^{\beta 3}$	3 ASP H N	5,50
6	2 CYS H $^{\beta 3}$	4 LEU H N	5,50
7	3 ASP H N	4 LEU H N	3,60
8	4 LEU H N	4 LEU H $^{\alpha}$	2,80
9	4 LEU H N	4 LEU H $^{\beta 2}$	3,60
10	4 LEU H N	4 LEU H $^{\beta 3}$	3,60
11	4 LEU H N	4 LEU QQ ^(a)	8,20
12	4 LEU H $^{\alpha}$	4 LEU H $^{\gamma}$	2,80
13	4 LEU H $^{\alpha}$	4 LEU QQ	8,50
14	4 LEU H $^{\alpha}$	5 PRO H $^{\delta 2}$	2,80
15	4 LEU H $^{\alpha}$	5 PRO H $^{\delta 3}$	2,80
16	4 LEU H $^{\gamma}$	5 PRO H $^{\delta 2}$	5,50
17	4 LEU H $^{\gamma}$	5 PRO H $^{\delta 3}$	5,50
18	6 CYS H N	6 CYS H $^{\alpha}$	2,80
19	6 CYS H N	6 CYS H $^{\beta 2}$	3,60
20	6 CYS H N	6 CYS H $^{\beta 3}$	3,60
21	6 CYS H $^{\beta 2}$	7 GLY H N	5,50
22	6 CYS H $^{\beta 3}$	7 GLY H N	5,50
23	7 GLY H N	8 VAL H N	3,60
24	8 VAL H N	8 VAL H $^{\beta}$	2,80
25	8 VAL H N	8 VAL QQ	10,60
26	8 VAL H N	9 TYR H N	3,60
27	8 VAL H $^{\alpha}$	8 VAL H $^{\beta}$	2,80
28	9 TYR H N	9 TYR Q	7,63
29	9 TYR H $^{\alpha}$	9 TYR H $^{\beta 2}$	2,80
30	9 TYR H $^{\alpha}$	9 TYR H $^{\beta 3}$	2,80
31	4 LEU Q	5 PRO Q	5,18

^(a) QQ = Bezeichnung für die Zusammenfassung der beiden sich drehenden Methylgruppen der Seitenkette

Die meisten Kreuzsignale weisen, wie erwartet, nur auf Abstände zwischen Protonen der gleichen Aminosäure oder der direkt benachbarten Aminosäuren hin. Einige der Signale geben jedoch eindeutig Hinweise auf eine makrozyklische Vorzugskonformation. An dieser Stelle ist insbesondere das Kreuzsignal zwischen His1 und Tyr9 (Kreuzsignale 1 und 2) bzw. Cys2 und Leu4 (Kreuzsignale 4 und 6) zu erwähnen.

Die experimentell gemessenen maximalen Abstände schränken die Anzahl potenziell möglicher Konformationen deutlich ein. Mit Hilfe des Found-Moduls⁷⁶ (ein Programm zur lokalen Konformationanalyse) wurden zunächst die Konsequenzen dieser Einschränkungen auf die molekularen Parameter des Nonapeptids (Dieder- und Bindungswinkel) ermittelt. Dadurch lassen sich für die [¹H,¹H]-ROESY-Kreuzsignale 39 Diederwinkelschränkungen für 25 Bindungswinkel bestimmen (siehe Abschnitt 9.1).

Die Tatsache, dass alle für den Nickel-Nonapeptidkomplex aufgenommenen Spektren nahezu identisch mit den Spektren des Nonapeptids selbst sind, ist eindeutig ein Hinweis auf ein gemeinsames Strukturmotiv. Daher ist anzunehmen, dass der grundsätzliche Aufbau des Nickel-Nonapeptidkomplexes dem des freien Nonapeptids entspricht. Um dies zu berücksichtigen, wurden an dieser Stelle in der Strukturermittlung weitere Einschränkungen (sechs obere und sechs untere Abstandseinschränkungen und die dazugehörigen Torsionswinkel) so definiert, dass die S^γ-Atome von Cys2 und Cys6 und die Rückgratstickstoffatome von His1 und Cys2 eine quadratisch-planare Koordination, um das Nickelion bilden (siehe Abschnitt 9.1).

Diese Einschränkungen bildeten die Basis der ersten Strukturermittlungen, die anschließend mit Hilfe des Diederwinkel-Optimierungs-Algorithmus im Programm CYANA⁷⁷ durchgeführt wurden. Dies ist eine Distanzgeometrie-Optimierungsmethode, die eine Vielfalt möglicher Konformationen auf Basis der experimentellen Struktureinschränkungen erzeugt. Als Eingabe dienen die Einschränkungen (ROE-Abstandsbereiche, -Diederwinkel) sowie programminterne van-der-Waals-Abstände der einzelnen Atome und die bekannte Primärstruktur des Nonapeptids.

Die zu berechnende Konformationsvielfalt wird als Baumstruktur betrachtet, die aus einem starren, im Raum fixierten Basiskörper (Ursprungspunkt) und starren Körpern (Atome) gebildet wird, die durch n rotierbare Bindungen miteinander verbunden sind.⁷⁸ Die kovalenten Strukturparameter (Bindungslänge, Bindungswinkel) werden während der Berechnung bei ihren üblichen Durchschnittswerten fixiert. Die 3D-Struktur eines einzelnen Konformers wird einzig und allein durch die Diederwinkelrotation definiert.

Durch Änderung der frei drehbaren Diederwinkel innerhalb erlaubter Intervalle werden zunächst alle Abstandseinschränkungen innerhalb eines Peptid-

fragmentes erfüllt. Anschließend werden Schritt für Schritt immer weiterreichende Abstandseinschränkungen berücksichtigt. Es wird eine Zielfunktion (letztendlich eine Fehlerfunktion) für jede errechnete Konformation definiert, die alle Verletzungen der vorgegebenen Abstands- und Diederwinkelsbeschränkungen sowie van-der-Waals-Abstände in einer errechneten Konformation enthält. Diese ist ein Maß dafür, inwieweit diese Konformation zur Beschreibung der experimentellen Daten dienen kann.

Die Freiheitsgrade bestehen dabei ausschließlich aus den Diederwinkeln. Die Zielfunktion (V) erfüllt dabei die Rolle der potentiellen Energie $E_{pot} = \omega_0 \cdot V$, mit einem Gewichtungsfaktor von $\omega_0 = 10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Die Zielfunktion (≥ 0) ist gleich Null, wenn alle experimentell ermittelten Bedingungen (Abstände und Diederwinkel) erfüllt sind und keine sterischen Hinderungen vorhanden sind. Je besser die Übereinstimmungen mit den experimentellen Einschränkungen, desto kleiner ist die Zielfunktion. Das Ziel der 3D-Strukturbestimmung ist daher die Minimierung dieser Fehlerfunktion (V) durch die Optimierung der Diederwinkel. In Tabelle 6.2 sind die Statistiken zur NMR und Distanzgeometrie-Optimierung angegeben.

Tabelle 6.2: NMR- und Verfeinerungsstatistik für die Nonapeptidstruktur und seines Nickelkomplexes

NMR Abstände und Diederwinkel-Einschränkungen (pro Monomer)		
Abstandseinschränkungen	31	
Nickelgeometrie-einschränkungen	6	
Diederwinkelsbeschränkungen	39	
Struktur Statistik		
Durchschnittsabweichung	Mittel	(s.d.)
Zielfunktion (\AA^2)	0,349	(0,0032)
Abstandseinschränkungen (\AA)	0,014	(0,0019)
Max. Abstandseinschränkungsverletzungen (\AA)	0,078	(0,0042)
Diederwinkelsbeschränkungen ($^\circ$)	0,011	(0,0112)
Max. Diederwinkelverletzungen ($^\circ$)	0,061	(0,0582)
Durchschnittliches r.m.s.d. (\AA)		
Schweratome (Aminosäuren 1-6)	0,94	(0,34)
Rückgratome (Aminosäuren 1-6)	0,19	(0,14)

Es ist möglich (und durchaus wahrscheinlich), dass eine große Vielzahl von Konformationen die experimentellen Einschränkungen erfüllen können. Daher wurden 100 Strukturen durch zufällige Torsionswinklereinstellung als Startpunkte für die Optimierung gewählt, um damit einen möglichst großen Strukturbereich für die möglichen lokalen Energieminima abzudecken.

Aus dieser Vielfalt von 100 Konformeren wurden zehn einzelne Strukturen mit den geringsten Werten für die Zielfunktion ausgewählt. Diese sind in Abbildung 6.5 dargestellt und repräsentieren die 3D-Struktur des Nonapeptids in Wasser und liefern einen Überblick lokaler konformationeller Variation des Nonapeptids bei Raumtemperatur.

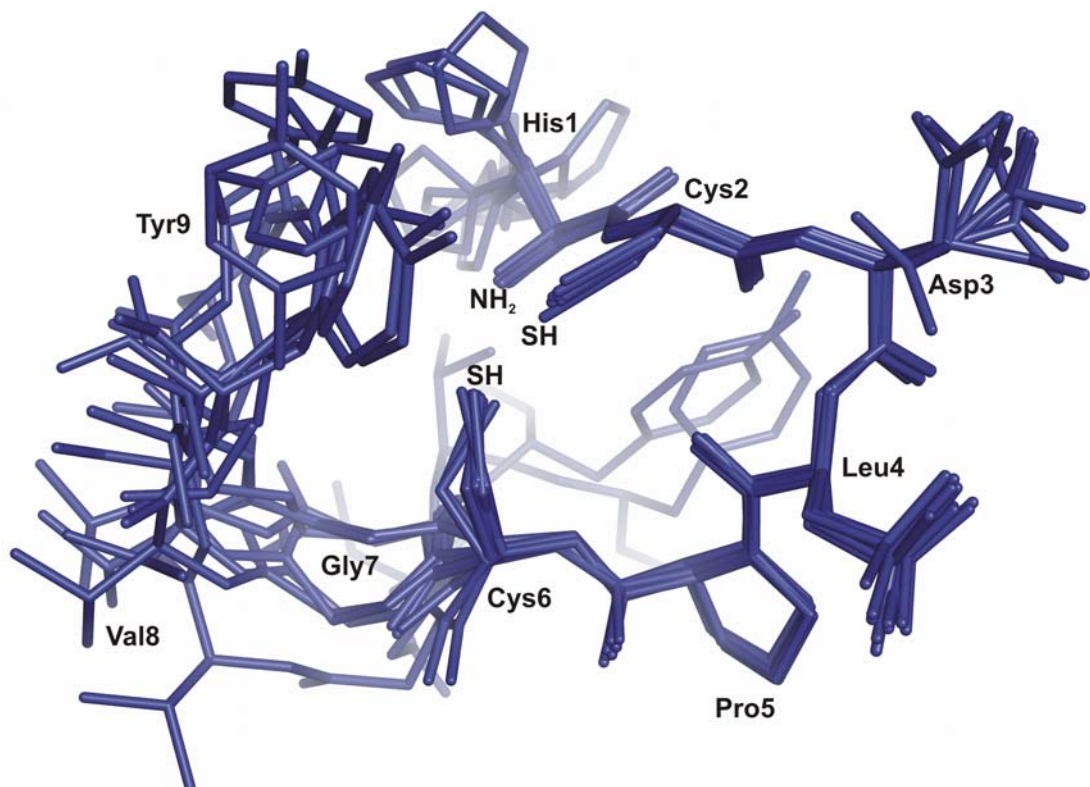


Abbildung 6.5: Konformationen von zehn 3D-Lösungsstrukturen resultieren aus NOE-Einschränkungen des Nonapeptids mit den niedrigsten Zielfunktionen aus CYANA

Eine sehr hohe Konformationskonvergenz wird bei den ersten sechs Aminosäuren des Peptidrückgrats beobachtet. Zwischen His1 und Cys6 wird eine einzige wohldefinierte Konformation ausgebildet, die deutlich an eine zyklische Makrostruktur erinnert. Die Seitenketten von drei dieser Reste (His1, Asp3 und Leu4) sind nach außen orientiert und zeigen eine etwas höhere thermische

Beweglichkeit als das Rückgrat. Die Beweglichkeit der Imidazolseitenkette von His1 ist dabei besonders hoch. Eine Teilnahme an der Nickelkomplexierung im Ringinneren der Seitenkette des Asp3 kann durch seine Orientierung nach außen ausgeschlossen werden. Die Thiolseitenkette des Cys2 als benötigter Ligand für die Nickelbindung zeigt ohne großen Bewegungsspielraum ins Innere der Ringstruktur. Ab Gly7 tritt eine zunehmende konformationelle Beweglichkeit der letzten drei Reste auf. Eine eindeutige Vorzugskonformation für diese drei Aminosäuren ist weder im Nonapeptid noch im Nickelkomplex vorhanden. Durch die zyklische Struktur befindet sich, trotz seiner Beweglichkeit, das Tyr9 in der unmittelbaren Nähe des Nickelzentrums. Durch seine Stellung und nicht zuletzt durch seine Beweglichkeit könnte der Tyrosinrest durchaus eine tragende Rolle in der katalytischen Umsetzung von O_2^- haben.

6.3 Verfeinerung der 3D-Struktur in Lösung

Die zehn aus den Distanzgeometrie-Optimierungen erhaltenen Konformere (Abbildung 6.5) mit den niedrigsten Werten in der Zielfunktion wurden von Stefan Zahn zwecks weiterer Strukturverfeinerung mit Hilfe von dichtefunktionellen Methoden nachoptimiert. Hierfür fand das BP86-Funktional^{79,80} und der SV(P)-Basis-Satz⁸¹ Verwendung. Alle Rechnungen nutzten die Multipole Accelerated Resolution of Identity Approximation (MARI-J)-Methode^{82,83,84}, welche in TURBOMOLE⁸⁵ implementiert ist. Um die Solvatationseigenschaften von Wasser explizit zu berücksichtigen, wurden sämtliche Strukturen mit Hilfe des **CONductor-like Screening MOdel** (COSMO)⁸⁶ optimiert. Dieses Modell behandelt das Solvent als ein einheitliches polarisierbares Medium, welches durch die Dielektrizitätskonstante hauptsächlich beschrieben wird. Das betrachtete Molekül wird dabei in eine passende Lücke dieses Mediums platziert.

Die DFT-Nachoptimierungen ergaben, dass alle zehn Konformere stationäre Punkte auf der Energiehyperfläche darstellen und somit als potentielle Konformationen betrachtet werden können.^b Ein weiterer Vorteil dieser nachoptimierten Geometrien sind zuverlässige Strukturparameter sowie relative Energien.

Die aus den BP86/SV(P)-Optimierungen gewonnenen Energien wurden zunächst verwendet, um mit Hilfe der statistischen Thermodynamik (Boltzmann-Verteilung) die relative Häufigkeit jedes einzelnen Konformers im Ensemble der

^b Um einen eindeutigen Beweis, dass es sich jeweils um Energie-Minima handelt, wären Frequenzrechnungen nötig. Aufgrund des technischen Aufwands musste darauf jedoch verzichtet werden.

zehn Konformationen abzuschätzen. Das Verhältnis zweier Konformere A und B [B ist das Konformer mit der niedrigsten Energie (globales Minimum)] ergibt sich aus der Boltzmann-Verteilung:

$$\frac{n(A)}{n(B)} = e^{-\frac{\Delta G_{AB}}{RT}} \approx e^{-\frac{\Delta E_{AB}}{RT}} \quad 6.3.1$$

Bei dieser Formel ist ΔE die relative Energiedifferenz zwischen den beiden Strukturen, T ist die Temperatur (300K) und R die universelle Gaskonstante. Anstatt der Gibbs-Energie (ΔG) wurde dazu die relative Energie (ΔE) an deren Stelle verwendet, da für eine Bestimmung von ΔG zahlreiche rechenintensive Frequenzrechnungen notwendig gewesen wären. Diese waren aufgrund technischer Begrenzungen nicht durchführbar.

In Abbildung 6.6 ist die ermittelte Häufigkeitsverteilung der einzelnen Konformere dargestellt. Auffallend ist, dass der Großteil der Isomere nur mit einer sehr geringen Häufigkeit (unter 0,01%) auftreten und können somit bei Raumtemperatur vernachlässigt werden.

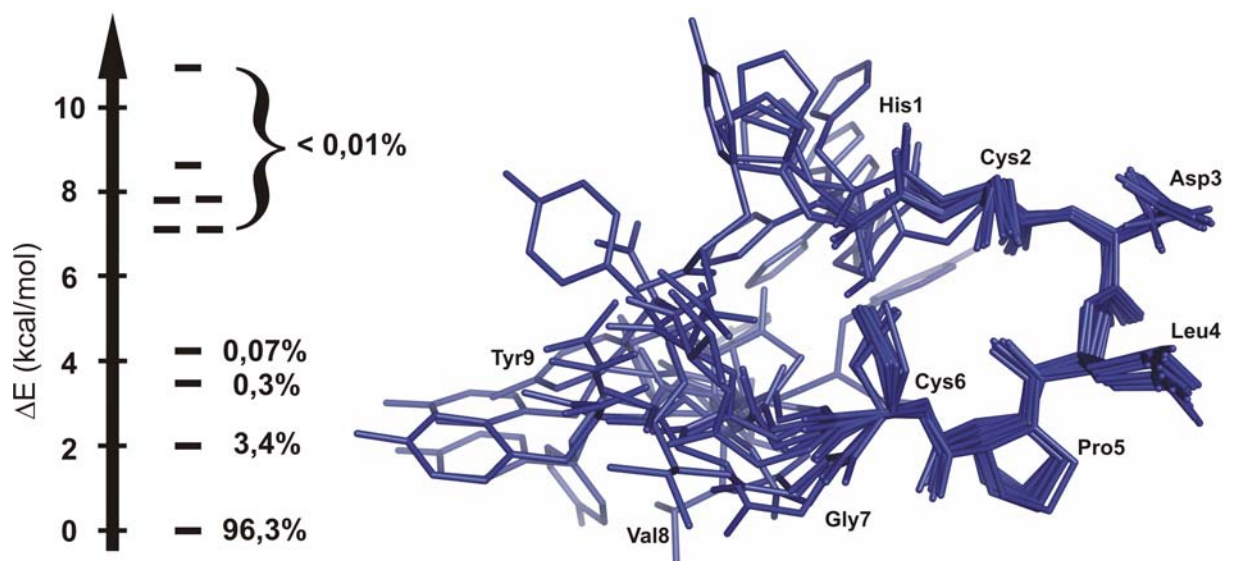


Abbildung 6.6: Die Konformationsvielfalt (zehn) des Nonapeptids sowie die relative Häufigkeit (Boltzmann-Verteilung) der einzelnen Konformere; berechnet auf dem BP86(MARI-J)/SV(P)/COSMO-Niveau

Lediglich zwei Konformere sind, aufgrund der BP86/SV(P)-Ergebnisse, in einem relativen Anteil von ca. 99% in wässrigen Lösungen vorhanden. Um das Verhältnis dieser beiden Konformere zueinander besser zu bestimmen, wurden sie auf dem höheren BP86/TZVP⁸⁷-Niveau ebenfalls unter Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten mit der COSMO-Methode nachoptimiert. Diese beiden Konformere

sind in Abbildung 6.7 illustriert und unterscheiden sich im Wesentlichen nur in der Position des His1 sowie in den drei flexibleren Gly7-, Val8- und Tyr9-Resten. Der sehr viel größere TZVP-Basissatz liegt nah am Basissatzlimit für die DFT-Methode; es ist daher eine ausreichend chemische Genauigkeit die Energie auf diesem Niveau zu erwarten.

Der Energieunterschied zwischen diesen beiden Konformeren beträgt 3,9 kcal/mol bzw. 16,3 kJ/mol. Laut der Boltzmannverteilung besteht auf diesem höheren Rechenniveau eine Gewichtung von ca. 99% zugunsten der stabileren Konformation. Da mittels NMR-Spektroskopie bei den hier vorliegenden Konzentrationen konformationelle Anteile unter 5% gewöhnlich nicht detektiert werden können, resultieren die experimentellen Spektren mit höchster Wahrscheinlichkeit nur aus dieser einzigen Konformation. Dies erklärt auch die außergewöhnlich scharfen Spektren.

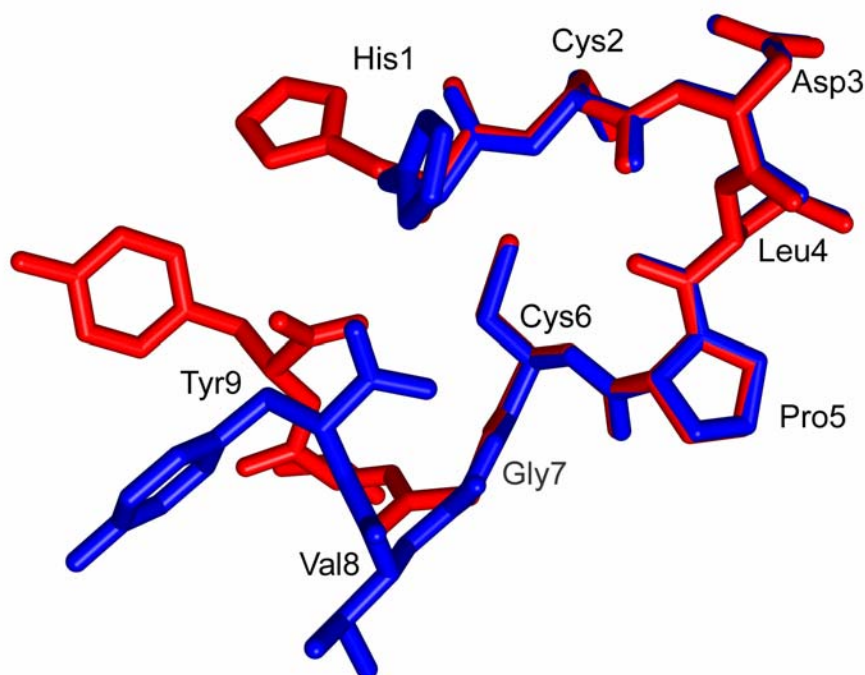


Abbildung 6.7: Die zwei auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau berechneten energetisch günstigsten Konformere des Nonapeptids

Diese Vorzugskonformation des Nonapeptids weist, wie schon in Abschnitt 6.1 erwähnt, erhebliche Unterschiede zu der in der Festkörperstruktur der NiSOD^{14,15} vorkommenden Nickelhakenkonformation auf.

Zum energetischen Vergleich dieser beiden Strukturen wurde deshalb die Koordinaten des Nickelhakens (pdb 1Q0M)¹⁵ in der Festkörperstruktur heraus-

geschnitten und das Nickelion entfernt. Diese Festkörperkonformation wurde anschließend auf dem BP86(MARI-J)/SV(P)/COSMO-Niveau nachoptimiert, damit seine strukturellen Parameter sowie Energie mit denen der 3D-Lösungsstruktur verglichen werden konnten. Die ersten sechs Aminosäuren dieser beiden Konformationen sind in Abbildung 6.8 überlagert. Die Festkörperstruktur besitzt eine um 20,3 kcal/mol (84,8 kJ/mol) höhere Energie im Vergleich mit der Vorzugskonformation des Nonapeptids und ist damit weniger stabil.

In beiden Strukturen wird eine makrozyklische Ringstruktur gebildet, um eine Bindestelle für das Nickelion zu erzeugen. Der Hauptunterschied zwischen der Festkörperstruktur und der 3D-Lösungsstruktur besteht in der Prolinkonformation, welche eine *cis*-Verknüpfung im Enzym und eine *trans*-Stellung im Nonapeptid aufweist.

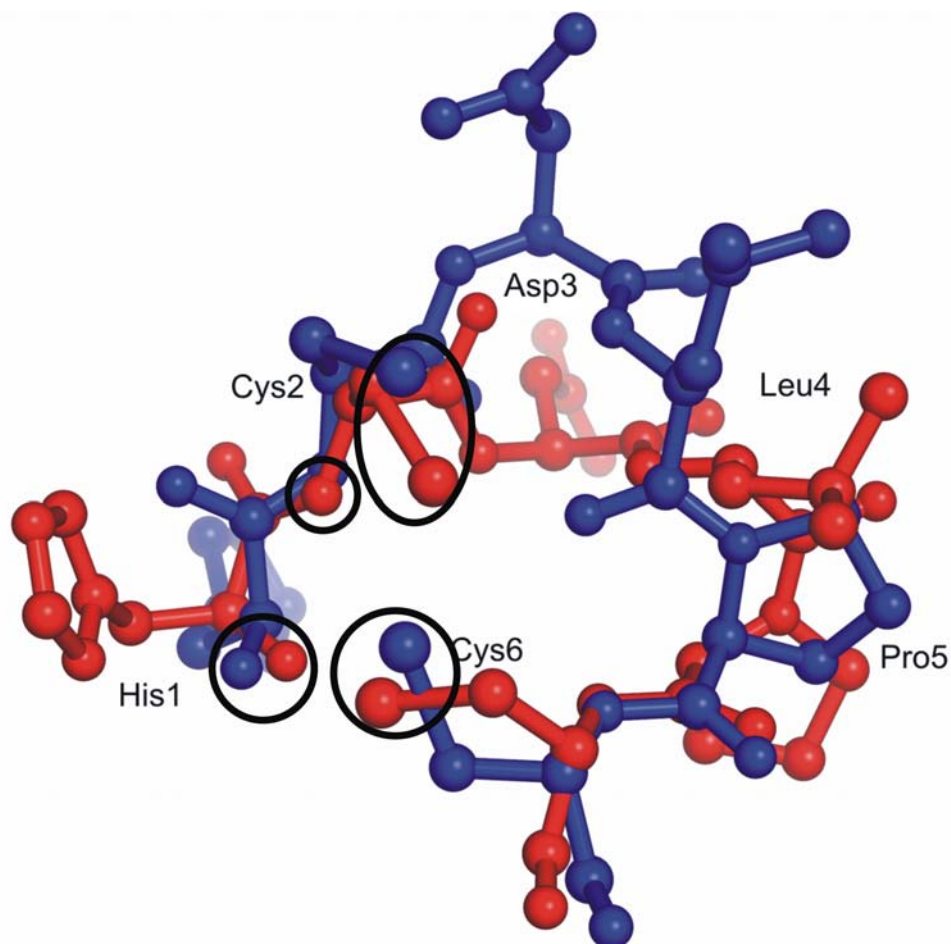


Abbildung 6.8: Vergleich der 3D-Vorzugskonformation in Lösung der ersten sechs Aminosäurereste des Nonapeptids (blau) mit der nachoptimierten Festkörperstruktur des Nickelhakens (rot). Die vier Liganden für die Ni^{II}-Komplexierung sind eingekreist, berechnet auf dem BP86(MARI-J)/SV(P)/COSMO-Niveau.

Dies hat sterische Konsequenzen im Ringsystem zur Folge. Die relative Position des Asp3-Restes wird z.B. in der Festkörperstruktur nach hinten gedreht. Überraschenderweise sind die Positionen der für die Nickelkomplexierung benötigten Liganden von der Pro5-Konformation weitestgehend unbeeinflusst.

Da *cis*- und *trans*-Prolin energetisch annähernd gleichwertig sind, haben normalerweise spezifische Wechselwirkungen des Prolinrings mit benachbarten Gruppen den ausschlaggebenden Einfluss auf die Einstellung der jeweiligen Vorzugskonformation.⁸⁸

Einige Bindungsabstände in der Festkörperstruktur der NiSOD deuten auf eine externe Stabilisierung des *cis*-Prolin-Konformation durch intramolekulare Wasserstoffbrücken hin. Diese sind in Abbildung 6.9 illustriert. Zum einen ist eine starke Ausrichtung der beiden Carbonylgruppen im Rückgrat (Amidbindungen zwischen Asp3, Leu4 und Pro5) zur Seitenkette des Arg39 vorhanden. Zusätzlich wird die Position des Asp3 durch externe Wasserstoffbrücken zu drei weiteren Resten (Lys89, Lys52 und Ser86) in einen die *cis*-Konformation stabilisierenden Wert festgehalten. Diese Reste fehlen natürlich im Nonapeptid.

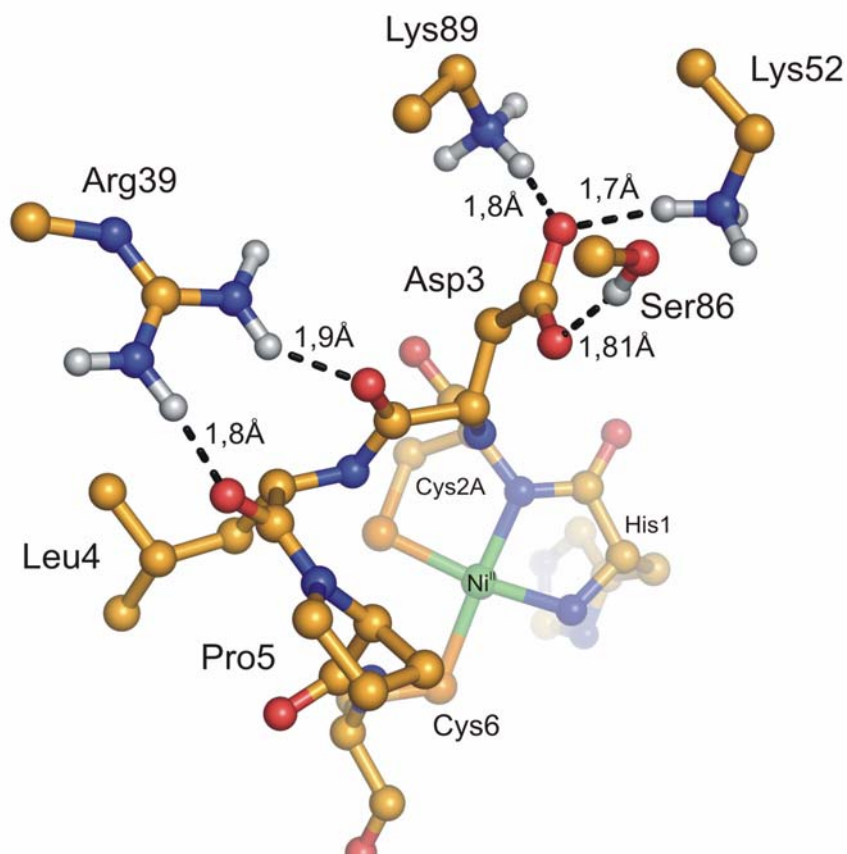


Abbildung 6.9: Externe Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung der *cis*-Prolin-Konformation in der Festkörperstruktur der NiSOD (*S. seoulensis*; pdb 1Q0M), Bindungslängen berechnet auf BP86(MARI-J)/TZVP-Niveau

6.4 Intramolekulare Stabilisierung der Ringkonformation

Als nächstes wurde in Zusammenarbeit mit Stefan Zahn, eine vertiefte Analyse der Wasserstoffbrückenbindungen durchgeführt. Hierzu wurde ein Hexapeptidmodell gewählt, bei dem His1 durch Alanin ersetzt wurde (Ala1-Cys2-Asp3-Leu4-Pro5-Cys6). Dadurch wird die Konformationsproblematik der Imidazolseitenkette vermieden. Die auf Cys6 folgenden drei beweglichen Aminosäuren (Gly7, Val8, Tyr9) wurden zur weiteren Vereinfachung durch eine Methylgruppe ersetzt (Abbildung 6.10). Dieses Modell war klein genug für eine intensive DFT-Studie der Wasserstoffbrückenbindungen der Ringstruktur auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau.

Abbildung 6.10 illustriert das Netz der vorhandenen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen in der zyklischen Makrostruktur. Durch diese zahlreichen intramolekularen Wechselwirkungen wird die *trans*-Stellung des Prolins stabilisiert.

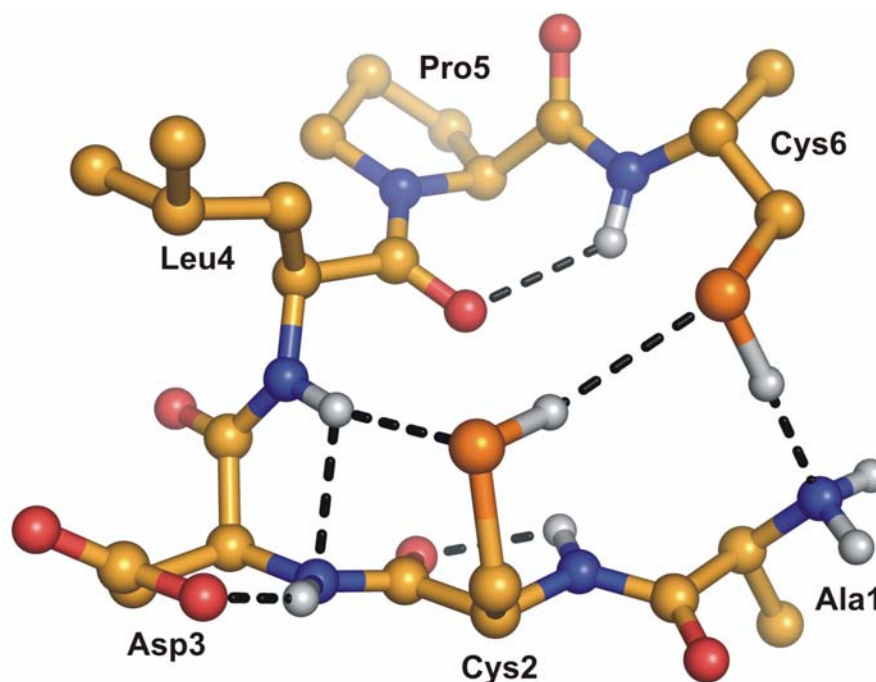


Abbildung 6.10: Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen in der *trans*-Prolin-Vorzugskonformation des Hexapeptidmodells, berechnet auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau

Für diese vertiefte Analyse wurde zuerst die Anwesenheit der Wasserstoffbrückenbindungen mit Hilfe einer „*natural bond orbital*“ (NBO)-Analyse⁸⁹ nachgewiesen. Eine NBO-Analyse weist auf die Existenz einer A...H-B Wechselwirkung durch das Vorhandensein einer Charge-Transfer-Wechselwirkung

zwischen den einsamen Elektronenpaar des Brückenheteroatoms A und dem antibindenden σ_{HB}^* -Orbital im Sinne einer hyperkonjugativen Wechselwirkung hin:



Damit kann jedoch nur eine Aussage über die Existenz (Anzahl und Position) der Wasserstoffbrückenbindungen erzielt werden. Sieben solcher Wechselwirkungen innerhalb des Hexapeptidmodells mit *trans*-Pro5 wurden auf diese Weise ermittelt (Abbildung 6.10). In der *cis*-Konformation des Pro5 (nach-optimiertes Hexapeptidmodell, angelehnt an die Festkörperstruktur) sind hingegen nur fünf Wasserstoffbrücken vorhanden (Abbildung 6.11).

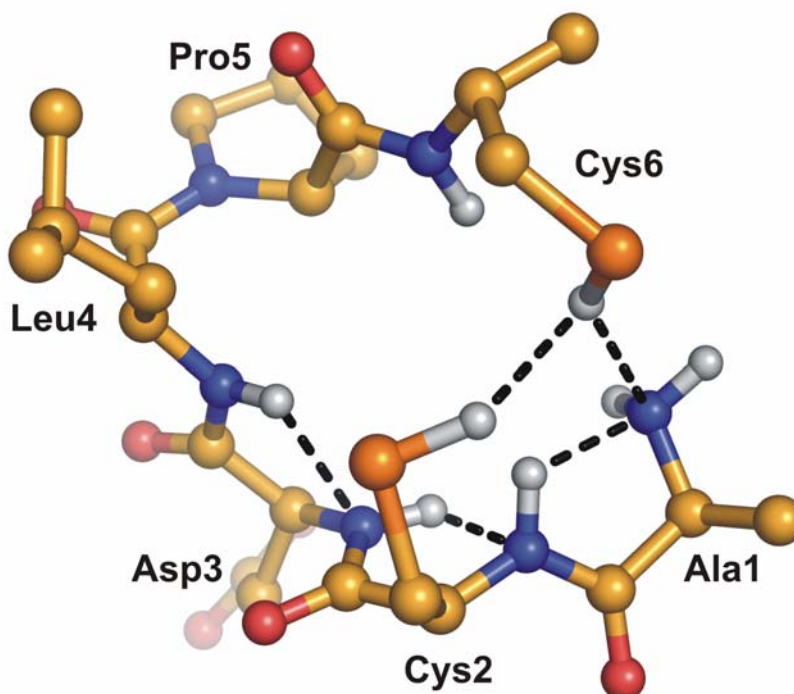


Abbildung 6.11: Die auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau berechnete energetisch günstigste Form des Hexapeptidmodells mit intramolekularen Wasserstoffbrücken für die *cis*-Konformation der NiSOD

Mit Hilfe einer weiteren Methode, die „two center shared electron numbers“ σ_{SEN} nutzt, kann die Stabilisierungsenergie einer Wasserstoffbrückenbindung abgeschätzt werden.⁹⁰ Die „two center shared electron number“ σ_{SEN} gibt dabei die Anzahl gemeinsam genutzter Elektronen zwischen zwei Atomen an. σ_{SEN} kann für die betrachtete Wasserstoffbrücke aus einer Standard-Orbitalanalyse entnommen werden. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen σ_{SEN} und der Stabilisierungsenergie der vorhandenen Wasserstoffbrückenbindung.⁹⁰ Über einen

empirischen Faktor λ kann damit die Bindungsenergie einer Wasserstoffbrückenbindung E_{HB} bestimmt werden.

$$E_{HB} = \lambda \cdot \sigma_{HB} \quad 6.4.2$$

Für Moleküle mit mehreren (n) Wasserstoffbrücken ergibt sich die gesamte Stabilisierung aus der Summe aller Beiträge:

$$E_{HB}^{ges} = \sum_{i=1}^n E_{HB}^i = \lambda \sum_{i=1}^n \sigma_{SEN} \quad 6.4.3$$

Der empirische Faktor λ ist dabei Basis und Funktionalabhängig. Da er für die neue Alrich TZVP-Basis nicht bekannt war, wurde er anhand einer Eichkurve empirisch gefittet (siehe Abschnitt 9.4). Zusammen mit σ_{SEN} wurde die Stabilisierungsenergie der Wasserstoffbrückenbindung aus der obigen Formel ermittelt. Dieser SEN-Analyse zufolge, beträgt die Wasserstoffbrücken-Stabilisierung in der *trans*-Prolin-Vorzugskonformation insgesamt 25,4 kcal/mol (106 kJ/mol). Das gleiche Hexapeptidmodellsystem für die *cis*-Prolinkonformation in der NiSOD ergibt dagegen eine Wasserstoffbrücken-Stabilisierung von nur 11,5 kcal/mol (48 kJ/mol). Das bedeutet eine relative Stabilisierung von 13,9 kcal/mol (58 kJ/mol) zugunsten der *trans*- gegenüber der *cis*-Prolinkonformation für das Hexapeptidmodell.

Da das Peptidrückgrat der ersten sechs Aminosäuren bei allen möglichen Konformeren in Lösung recht ähnlich ist, wurden nun weitergehende Studien mit dem Ziel, die Stabilität des Rückgrates in der Ringstruktur, sowie den Einfluss der Seitenkettenorientierung auf die Energie zu ermitteln, angefertigt. Diese Berechnungen zeigten, dass gezielte Manipulationen des Rückgrats jedes Mal zu einer deutlichen Destabilisierung führten. Zum Beispiel eine Drehung der Amidbindung zwischen Pro5 und Cys6 um 180° destabilisierte die Ringstruktur um 4,4 kcal/mol (18,4 kJ/mol). Diese kann durch die Verhinderung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Amidproton von Cys6 und dem Carbonylsauerstoff von Leu4 (Abbildung 6.10) erklärt werden. Neben den Wasserstoffbrückenbindungen sind auch die planaren Peptidbindungen an der Stabilisierung beteiligt. Im Gegensatz zur Festkörperstruktur, sind die Stickstoffatome in den Peptidbindungen durchwegs sp^2 -hybridisiert, welches zu einer Festigung der Ringstruktur führt. Die meisten nach außen orientierten Seitenketten zeigten hingegen kaum Einfluss auf die relativen Energien der einzelnen Isomere. Lediglich eine Veränderung in der Position der Carbonylseitenkette im Asp3 erbrachte einen sichtbaren Einfluss auf die Energie, durch die Ausbildung einer stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindung des Carbonylsauerstoffs der Seitenkette zum Amidwasserstoff von Asp3. Diese intraresiduale Wasserstoffbrücke hat aber voraussichtlich keinen Einfluss auf die Konformationstabilität.

6.5 Erste Untersuchungen zum Spin-Zustand des Nickels

Im NiSOD-Enzym liegt ein großer Teil der gebundenen Nickelionen als paramagnetisches Ni^{III} im Aktivzentrum vor.¹⁴ Da keine Linienverbreiterung oder Signalverschiebung bei den NMR-Experimente des Nickel-Nonapeptidkomplexes, wie sie bei paramagnetischen Übergangsmetallen gewöhnlich auftreten, beobachtet werden konnte, weist dies auf die Anwesenheit von diamagnetischen Ni^{II}-Ionen im Biomimetikum hin. Wie schon in Abschnitt 4.3 erläutert wurde, konnte kein Signal bei ESR-Experimenten detektiert werden. Für eine Resonanz bei ESR-Experimenten ist ein paramagnetisches Übergangsmetall notwendig. Ohne ein Signal weist dieses Experiment somit eher auf diamagnetische Nickelionen hin.

Das Ni^{II} kann in zwei unterschiedlichen Spinkombinationen (High und Low) auftreten. Von den Daten aus den XAS-Experimenten (*X-ray Absorption Spectroscopy*) des Modellsystems von Shearer (erste zwölf Aminosäuren der NiSOD) wird ein Lowspin-Zustand für das Nickelion diskutiert.

Die ESR-Experimente für den Ni²⁺-Nonapeptidkomplex deuten zwar auch auf ein diamagnetisches Nickelion im Lowspin-Zustand hin, zur Bestätigung wurde aber DFT-Rechnungen des Low- bzw. Highspin-Zustandes des Nickelions im Nonapeptid angefertigt. Für die Optimierung fand wieder das BP86-Funktional⁷⁹ mit dem TZVP-Basisatz⁸⁷ Verwendung. Als Ausgangstruktur wurde die energetisch günstigste Konformation des Nonapeptides in Lösung verwendet. Für die Berechnung wurde von einem Nickelzentrum, ähnlich wie in der Festkörperstruktur der NiSOD, mit den S^γ-Atomen von Cys2 und Cys6 sowie dem N-terminalen Stickstoffatome des His1 und dem Rückgratstickstoffatom des Cys2 als Liganden ausgegangen. Nach Einstellung des Low bzw. Highspin-Zustandes wurde der resultierende Nickelkomplex frei optimiert. Lösungsmittelleffekte wurden mit Hilfe des COSMO-Modells bei der Optimierung explizit berechnet.

Da das BP86-Funktional keine korrekten Energien für Spinzustände liefert (der Lowspin-Zustand wird stets überbewertet)⁹¹, wurden anschließend eine Optimierung des kleineren Hexapeptidmodells (wie in Abschnitt 6.3) mit Nickel durch das B3LYP*-Funktional⁹¹ und dem SV(P)-Basisatz⁸¹ ohne Solvatationseffekte und MARI-J-Näherung angefertigt. Diesen Berechnungen zufolge, wird der Highspin-Zustand leicht bevorzugt 2,7 kcal/mol (11,3 kJ/mol). Da dies aber im Fehlerbereich der Methode liegt, muss man davon ausgehen, dass beide Zustände vorkommen könnten. Unter Umständen könnte ein sehr leichter Übergang zwischen beiden Spinzuständen vorliegen.

Je nachdem, ob das Nickelion sich im Highspin- oder im Lowspin-Zustand befindet, liegt eine veränderte Ligandenstruktur vor. Der Lowspin-Zustand (Abbildung 6.12) des Komplexes besitzt, wie erwartet, eine quadratische-planare Umgebung. Durch das Peptidrückgrat und vor allem durch den Carbonylsauerstoff

der Amidbindung zwischen Leu4 und Pro5 wird eine Seite für eine mögliche O_2^- -Anbindung blockiert. Wie in der Einleitung schon diskutiert, wird für die Stabilisierung des Ni^{III} -Komplexes der Imidazolring von His1 als fünfter Ligand angenommen. Aufgrund der Blockierung durch das Rückgrat kann, solange die O_2^- -Bindung besteht, auf der gegenüberliegenden Seite der Imidazolring nicht als Ligand fungieren. Durch seine räumliche Nähe von 3,1 Å kann die Aufgabe der Ni^{III} -Komplexstabilisierung eventuell durch den Carbonylsauerstoff von Leu4 erfüllt werden.

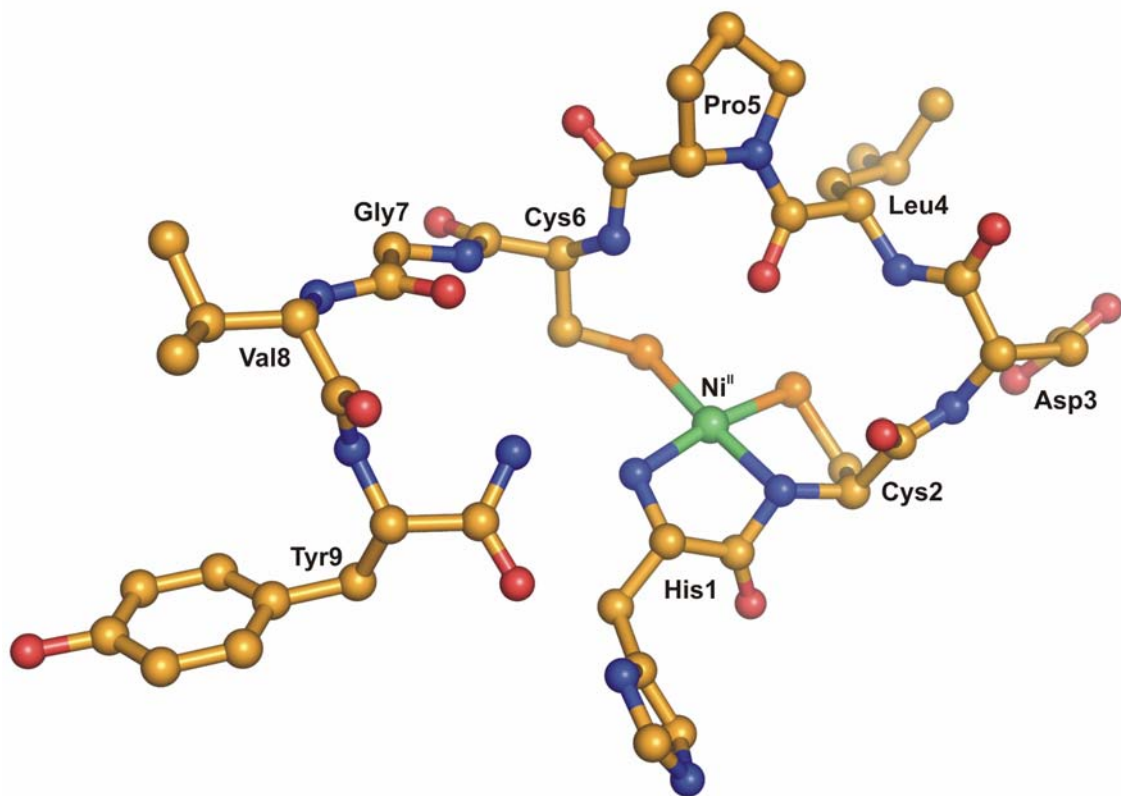


Abbildung 6.12: Auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau optimierter Lowspin-Nickelkomplex des Nonapeptides

Im Highspin-Komplex (Abbildung 6.13) verdichtet sich die Abschirmung einer Seite des Biomimetikums durch den geringeren Abstand der Carbonylgruppe der Amidbindung Leu4/Pro5 zum Nickelion. Damit wird eine quadratisch-pyramidale Anordnung der Ligandenumgebung um das Nickelion erzeugt. Wie im Lowspin-Komplex ist auch hier der Imidazolring von His1 nach außen gedreht und zeigt keine Interaktion mit dem Nickelzentrum. Mit seinen fünf Liganden ähnelt der Komplex eher dem in der Einleitung diskutierten Ni^{III} -Komplex im Enzym. Der Zugang zum Nickelzentrum ist dadurch nur von der gegenüberliegenden Seite aus zugänglich. Der Imidazolring kann, wie im Lowspin-Komplex, nicht als Ligand dienen ohne die Koordinationsstelle der O_2^- zu versperren.

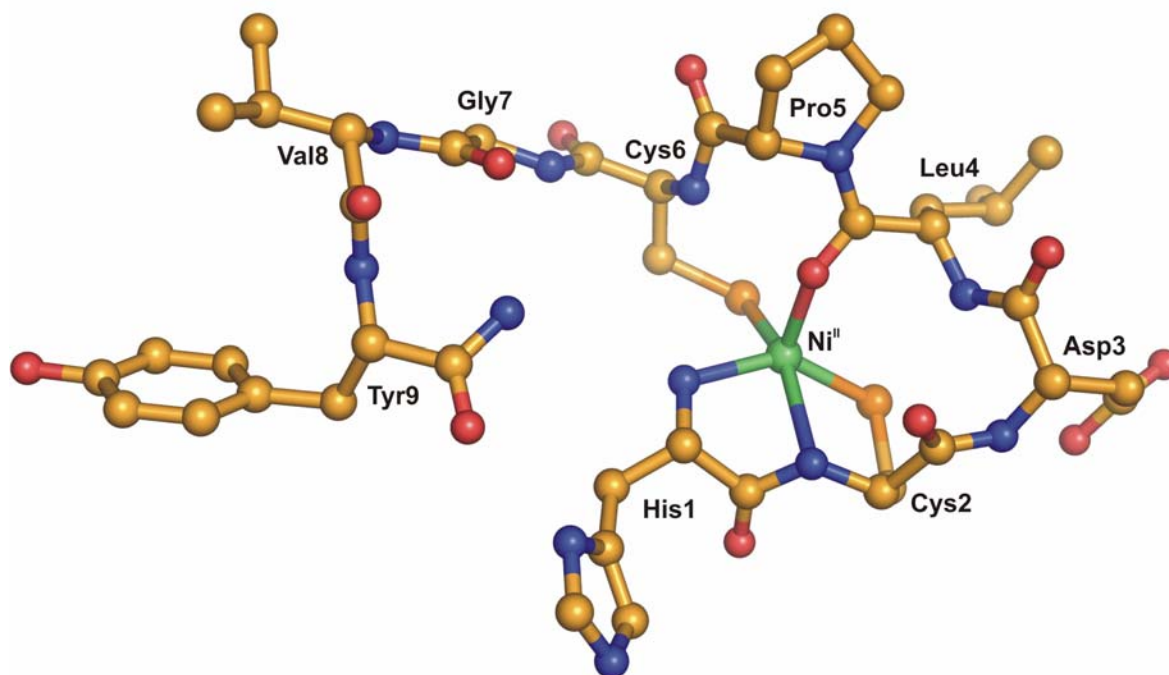


Abbildung 6.13: Auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau optimierter Highspin-Nickelkomplex des Nonapeptides

Die Bindungsabstände der Liganden zum Nickelion für den Low- und Highspinkomplex sind in Tabelle 6.3 aufgeführt. Wie zu erkennen ist, haben die vier Liganden von N^{His1} , N^{Cys2} , S^{Cys2} , und S^{Cys6} im Lowspin-Komplex durch ihre quadratisch-planare Anordnung einen etwas geringeren Abstand zum Nickelion als im Highspin-Komplex. Der Carbonylsauerstoff der Amidbindung Leu4/Pro5 ist dagegen im Highspin-Komplex viel näher und kann daher als Ligand fungieren. Im Lowspin-Komplex ist der Abstand dennoch zu gering für einen freien Zugang an dieser Seite.

Tabelle 6.3: Bindungsabstände (in Å) des Low- und Highspinkomplexes; berechnet auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau

	d_{NiNHis1}	d_{NiNCys2}	d_{NiSCys2}	d_{NiSCys6}	d_{NiOLEu4}
Lowspin	1,98	2,00	2,20	2,20	3,09
Highspin	2,15	2,47	2,28	2,31	2,07

Sowohl beim Lowspin- wie auch beim Highspin-Komplex ist die Koordinierung des Superoxidradikals somit aufgrund der Blockierung durch das Rückgrat nur von

einer Seite aus möglich. Der Imidazolring des Histidins hat damit keine Koordinationsstelle frei, um als Ligand zu fungieren, während das Radikal gebunden wird. Daher kann ein Einfluss dieser Seitenkette als zusätzlicher Nickel-ligand im Katalysezyklus des Biomimetikums als unwahrscheinlich angenommen werden. Eine Koordination des Imidazolrestes würde eher die katalytische Aktivität behindern. Dies steht im Widerspruch zu vielen Untersuchungen des Reaktionszyklus der NiSOD, bei denen die Seitenkette des Histidins eine wichtige Rolle zugesprochen wird.^{14,29,36,37}

Die Festkörperstruktur der NiSOD zeigt einen Substratkanal, der genau von der Seite ins Zentrum führt, die im Biomimetikum von dem Carbonylsauerstoff behindert wird. Im Vergleich mit den vorgenommenen quantenchemischen Studien zeigt sich ein fundamentaler Unterschied in einem möglichen Katalyseweg zwischen dem Biomimetikum und dem Enzym. Dies resultiert aus den unterschiedlichen Diastereomeren des Prolins (Abschnitt 6.1). Das *cis*-Prolin im Enzym ermöglicht eine offene Struktur an der Seite mit dem Substratkanal. An dieser Stelle wird das Superoxidradikal auch optimal gebunden und katalytisch umgesetzt. Durch das *trans*-Prolin ist dies im Nonapeptid in der Form nicht möglich.

7 Mechanistische Untersuchungen

7.1 Modifizierung des Biomimetikums

Nachdem die 3D-Struktur des Nonapeptids in Lösung sowie dessen [1:1]-Nickelkomplex aufgeklärt werden konnte, wurden erste mechanistische Untersuchungen zum „*mode of action*“ des Biomimetikums durchgeführt. In erster Linie basieren diese auf gezielten Mutationen der Nonapeptidsequenz mit anschließender Bestimmung der SOD-Aktivität der Mutanten. Dadurch können Rückschlüsse auf die für die Katalyse notwendige Funktionalitäten und Strukturelemente gewonnen werden.

Ziel war es, ein kleinstmögliches strukturelles Leitmotiv für einen funktionellen SOD-Katalysator auf Peptidbasis zu entwickeln.

7.1.1 Rolle des Histidins

Das His1 ist in allen bekannten NiSODs streng konserviert. Wird diese Aminosäure gegen Glutamin im Enzym ausgetauscht (H1Q-SOD-Mutante; *S. coelicolor*), sinkt die SOD-Aktivität um zwei Größenordnungen gegenüber dem Wildtyp.²⁹ ESR-Messungen am H1Q-Mutant wiesen darauf hin, dass ein nicht detektierbares diamagnetisches Ni^{II}-Ion vorliegt, während im Wildtyp vielmehr ein fünffachkoordiniertes paramagnetisches Ni^{III}-Ion nachgewiesen werden konnte.²⁹

Aus Mutationsexperimenten des NiSOD-Enzyms ist ersichtlich, dass His1 für die elektronische Struktur des zentralen Nickelions sowie für die katalytische Aktivität des Enzyms von großer Bedeutung ist.¹⁵ Weitere Mutationsexperimente mit anschließenden SOD-Aktivitätsbestimmungen bestätigten die Relevanz von His1. Der Austausch von His1 durch Ala, Cys, Asp, Lys, Asn, Gln, Arg, Trp und Tyr ließ die Aktivität jeweils auf unter 5% gegenüber dem Wildtyp-Enzym sinken.¹⁵ Keine der Seitenketten dieser Aminosäuren kann den Imidazolring von His1 adäquat ersetzen. Damit ist definitiv nachgewiesen, dass His1 eine essentielle Bedeutung für die enzymatische Katalyse besitzt.

Die Funktion von His1 wird in vielen Publikationen anhand experimenteller Ergebnisse sowie computergestützten Rechnungen diskutiert.^{14,29,36,37} Wie bereits in der Einleitung beschrieben, dient His1 als fünfter Ligand für die Stabilisierung des Ni^{III}-Zustandes. Im quadratisch planaren Ni^{II}-Zustand ist His1 nicht gebunden. In beiden Oxidationsstufen wird His1 durch eine Wasserstoffbrücke zum Glutaminsäurerest 17 stabilisiert. Im Ni^{II}-Zustand ist eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Rückgratcarbonyl von Val8 vorhanden (Abbildung 7.1).

7 Mechanistische Untersuchung

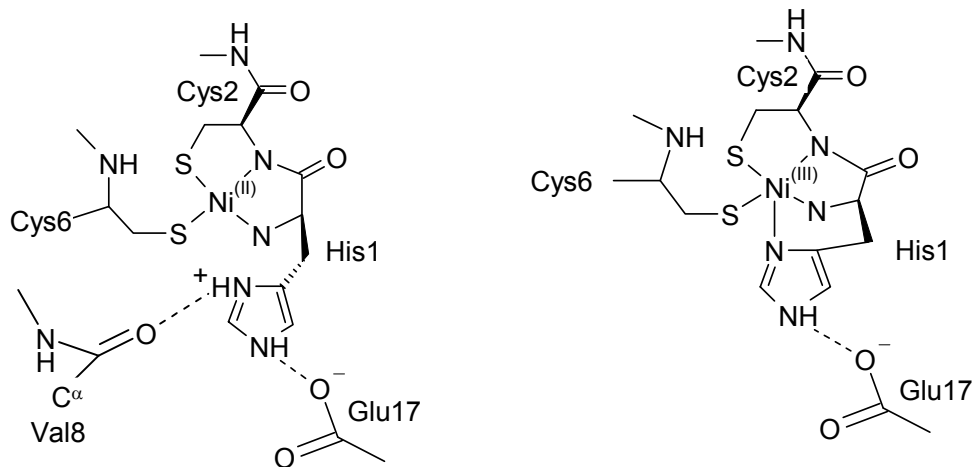


Abbildung 7.1: Aktivzentrum der NiSOD mit Ni^{II} im Zentrum (links), Ni^{III} und der Imidazolring von His1 als fünften Liganden (rechts)

Eine weitere potentiell wichtige Rolle der Imidazolseitenkette im „*mode of action*“ besteht als Protonenlieferant für die Erzeugung von H₂O₂.^{34,36,37} Eine Möglichkeit hierfür besteht in der Übertragung eines Protons von His1 zuerst auf die Thiolatgruppe des Cys6 und von dort auf das Superoxidradikal-Anion. Dabei erhält der Imidazolrest von His1 das Proton von Glu17. Als Unterstützung für diese Hypothese ist die Mutation von Glu17 zu Ala zu erwähnen, welche den Verlust der SOD-Aktivität im Enzym zur Folge hat.¹⁵ Daneben könnte Glu17 auch für die korrekte Positionierung von His1 im nichtgebundenen Ni^{II}-Zustand verantwortlich sein. Es gibt einige Anzeichen die darauf hindeuten, dass dieser Fall besteht. Unter anderem kann nicht genau geklärt werden, wie die Protonenübertragung von Glu17 auf His1 und von dort auf einen Nickelliganden geschieht, da kaum Platz für die benötigte Imidazolbewegung vorhanden ist.

Um die Rolle des His1 im Biomimetikum zu überprüfen, wurde ein modifiziertes Nonapeptid hergestellt in dem His1 durch Alanin ersetzt wurde. Die Synthese des modifizierten Nonapeptides erfolgte analog zur natürlichen Sequenz ohne Probleme. Auch die Aufreinigung konnte problemlos durchgeführt werden. Ähnliche der natürlichen Sequenz, lagert die Mutante TFA-Salze nach der Reinigung an (Abschnitt 2). Der Peptidgehalt in der Festphase wurde mit Hilfe einer Aminosäurenanalyse bestimmt und lag bei etwa 80%. Die Aktivitätsmessungen enthalten daher eine Massenkorrektur.

Die SOD-Aktivitätsbestimmung mit dem McCord/Fridovitsch Testsystem wurde unter Standardbedingungen mit einer möglichst geringen Peptidkonzentration (0,34 μ M) vorgenommen, um außerhalb des substratlimitierten Bereiches zu arbeiten. Die vermessenen Lösungen enthielten einen Überschuss von drei Nickeläquivalenten pro Peptid. Die Durchführung der Aktivitätsmessungen erfolgte analog zum unmodifizierten Biomimetikum (Abschnitt 5.3).

Der Histidinaustausch lässt die Aktivität des Biomimetikums nur sehr schwach absinken und liegt mit etwa 1900 U/ μmol noch im Fehlerbereich des unmodifizierten Biomimetikums (Abbildung 7.2). Der Imidazolring scheint damit keinen größeren Einfluss auf die Aktivität des Ni^{II}-Peptidkomplexes zu haben. Im Biomimetikum kann somit auf den Histidinrest verzichtet werden.

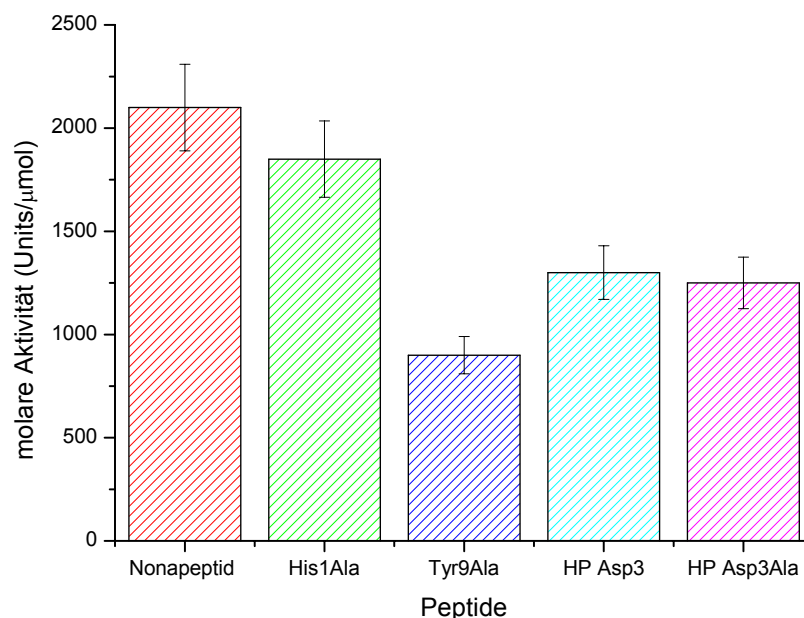


Abbildung 7.2: Vergleich der molaren Aktivitäten der modifizierten Peptide (Fehlerbalken 10%): Nonapeptid= unmodifiziertes Nonapeptid; His1Ala = His1Ala-Mutante; Tyr9Ala = Tyr9Ala-Mutante; HP Asp = Ala1-Cys2-Asp3-Ala4-Pro5-Cys6; HP Asp3Ala = Ala1-Cys2-Ala3-Ala4-Pro5-Cys6.

Die beim NiSOD-Enzym diskutierte Rolle des Histidins kann somit nicht auf das Biomimetikum übertragen werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in den durch Pro5 verursachten konformationellen Unterschieden zwischen Biomimetikum und Enzym. Im Nonapeptid liegt eine *trans*-Verknüpfung des Pro5 vor, während das Enzym eine *cis*-Verknüpfung aufweist (Abschnitt 6.1).

Wie bereits in Abschnitt 6.5 diskutiert, liefern DFT-Rechnungen am Biomimetikum ein genaueres Bild der Nickelumgebung. Hier zeigt sich auch die mögliche Erklärung für die annähernd gleich bleibende Aktivität des Nonapeptides trotz Histidinaustausches. Durch die Konformationsänderung aufgrund des *trans*-Prolins und die damit verbundene Abschirmung einer Seite des Nickelkomplexes kann das Superoxidradikal nur von der Seite mit dem Imidazolrest angreifen (Abbildung 6.13 in Abschnitt 6.5). Zudem besteht die Möglichkeit, dass der für eine Stabilisierung des Ni^{III}-Zustandes benötigte fünfte Ligand vom Rückgrat

7 Mechanistische Untersuchung

(Carbonylsauerstoff der Leu4-Pro5-Amidbindung) bereitgestellt wird (Abschnitt 6.2).

Eine weitere Rolle könnte die Imidazoleitenkette als Protonenlieferant oder zur O_2^- -Stabilisierung innehaben. Damit ließe sich die leicht verringerte Aktivität neben Messfehlern beim Ersetzen von His1 auch erklären. Diese Rolle als Protonenlieferant scheint im Biomimetikum dann aber nicht besonders ausgeprägt zu sein, da die Aktivität nur minimal verringert wurde.

Die strukturellen Umstände im Biomimetikum weisen auf einen grundsätzlich anderen „*mode of action*“ als im Enzym hin. Anstatt wie bei der NiSOD durch einen elektrostatischen Kanal zur Bindestelle dirigiert zu werden, um dort umgesetzt zu werden, ist im Biomimetikum das katalytische Zentrum viel leichter zugänglich. Trotzdem besitzt das Biomimetikum nur etwa 20% der SOD-Aktivität der aus *s. acidiscabies* isolierten NiSOD (Abschnitt 5.4).⁷¹

7.1.2 Rolle des Prolins

Die Bedeutung von Pro5 in der NiSOD-Sequenz wurde bisher durch keine Mutationsexperimente im Enzym untersucht. Um der Rolle von Pro5 im Biomimetikum näher nachzugehen, wurde ein Nonapeptidmutante synthetisiert, bei dem Pro5 durch Alanin ersetzt wurde. Dieses modifizierte Nonapeptid konnte zwar synthetisiert werden, ließ sich aber nicht aufreinigen oder weiterverarbeiten. Beim Lösen in gängigen Lösungsmitteln wie Wasser/Acetonitril oder Methanol, bildete es bei geringen Konzentrationen sofort eine Trübung. Daraufhin fällt ein weißer, nicht näher charakterisierbarer Feststoff aus. Nach anschließender Filtration ist kaum noch Peptid in der Mutterlauge nachzuweisen.

Die 3D-Lösungsstruktur des Biomimetikums weist darauf hin, dass die Prolin-konformation offensichtlich von entscheidender Bedeutung für die vorgefaltete makrozyklische Ringstruktur ist (Abschnitt 6.1). Neben dem bereits diskutierten Einfluss einer *cis*- oder *trans*-Verknüpfung des Prolinrestes auf die Proteinkonformation, ist Prolin häufig in Aminosäuresequenzen anzutreffen, die einen „*turn*“ in die Sekundärstruktur einführen.⁹²

Durch die Makrostruktur des Nonapeptides werden die Thiolgruppen der beiden Cysteine innerhalb der zyklischen Makrostruktur abgeschirmt und somit stabilisiert. Durch das Fehlen von Pro5 wird diese zyklische Makrostruktur höchstwahrscheinlich zerstört. Dadurch könnte die vermehrte Bildung intermolekularer Disulfidbrücken im Sinne einer Peptidpolymerisation die beobachtete weiße Trübung erklären. Diese Modifizierung wurde nicht weiter bearbeitet.

7.1.3 Rolle des Tyrosins

Wie in Abbildung 1.3 illustriert, wird Tyr9 eine aktive Rolle im „*mode of action*“ zugesprochen.^{14,37} Mutationsexperimente im Enzym zeigen einen deutlichen Aktivitätsverlust (Aktivität < 5% gegenüber dem Wildtyp) beim Austausch von Tyr9 durch Alanin.¹⁵ Wird Tyr9 durch Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten (Phe, Trp) ersetzt, ist eine Absenkung der Aktivität (auf 80% bzw. auf 50%) nachzuweisen. Die SOD-Aktivität bleibt dennoch grundsätzlich erhalten. Der aromatische Ring scheint daher eine wichtige Rolle in der enzymatischen Katalyse zu erfüllen. Weiterhin wird die Phenolgruppe in Tyr9 als möglicher Protonenlieferant für die Bildung von H₂O₂ diskutiert.^{14,37} Dies kann aber den beobachteten Erhalt der SOD-Aktivität beim Austausch von Tyr9 mit Phenylalanin nicht erklären. Eventuell hilft der aromatische Ring lediglich bei der Positionierung und Stabilisierung des Superoxidradikals im Zentrum. Die Protonenübertragung muss dann über einen anderen Weg laufen. Im „*mode of action*“ der Ribonukleotidreduktase bildet Tyrosin ein Tyrosylradikal als Intermediat.⁹³ Eventuell spielt dieser Aspekt in der NiSOD auch eine Rolle, indem Tyr9 auch hier zwischenzeitlich ein Radikalelektron aufnehmen könnte. Hierzu gibt es bisher keine Untersuchungen.

Das Tyr9 im Nonapeptid befindet sich, obwohl die letzten drei Aminosäuren eine hohe Beweglichkeit aufweisen, in der Nähe des Metallzentrums und könnte daher eine Rolle im Katalysemechanismus übernehmen. Um dies zu überprüfen, wurde eine Mutante (Tyr9Ala) synthetisiert, in der Tyr9 durch Alanin ausgetauscht wurde. Sowohl die Synthese wie auch die Aufreinigung verliefen analog zum unmodifizierten Nonapeptid ohne Schwierigkeiten. Eine anschließende Aminosäurenanalyse ergab einen Peptidgehalt von etwa 80% im festen Zustand (TFA-Anlagerungen).

SOD-Aktivitätsbestimmungen an diese Mutante zeigen eine Verringerung der Aktivität gegenüber dem Nonapeptid von über 50% (Abbildung 7.2) Dies weist einen erheblichen Einfluss des Austausches vom Tyrosinrest auf die Katalyse nach. Ob Tyr9 als Protonenlieferant dient oder irgendeinen anderen Zweck bei der Katalyse besitzt, können nur weitere Untersuchungen zeigen. Vor allem ist zu bemerken, dass eine erhebliche Aktivität auch ohne Tyr9 besteht im Gegensatz zum Enzym. Dies weist zwar auf eine Beteiligung des Tyr9 im „*mode of action*“ des Biomimetikums hin, Tyr9 besitzt aber keine essentielle Funktion. Auch im Nonapeptid wäre eine Mutation von Tyr9 zu Phenylalanin angebracht, um einen möglichen Einfluss des aromatischen Ringes näher zu untersuchen.

7.2 Hexapeptid

Das Ziel für ein Biomimetikum ist ein möglichst kleines funktionsfähiges Modell zu erzeugen. Daher war der nächste Schritt die Verkleinerung des Nickel-Peptidkomplexes. Da die Tyr9Ala-Mutation einen aktiven Komplex erzeugten und keine Anzeichen bestanden, dass Gly7 und Val8 weitergehende Funktion im Nickelhaken besitzen, wurde das Nonapeptid um die letzten drei Aminosäurereste auf ein Hexapeptid verkürzt. Dieses sollte bei nachgewiesener SOD-Aktivität als Grundlage für weitere Vereinfachungen dienen.

Zuerst wurde ein Hexapeptid, analog zum Nonapeptid, mit folgender natürlichen Sequenz His1-Cys2-Asp3-Leu4-Pro5-Cys6 synthetisiert. Die Synthese wie auch die Aufreinigung verlief problemlos. Durch SOD-Aktivitätsbestimmungen konnte eine grundsätzliche Aktivität des Hexapeptids nachgewiesen werden. Dies zeigt wiederum, dass die letzten drei Aminosäuren nicht unbedingt notwendig sind. Das unmodifizierte Hexapeptid selbst wurde nicht weitergehend untersucht, da das Ziel weitere Vereinfachungen waren.

7.2.1 Rolle der N-terminalen Aminogruppe

Neben der Thiolatgruppe eines Cysteins im Nickelhaken könnte auch die N-terminale Aminogruppe His1 eine Rolle bei der Protonenübertragung auf das Substrat spielen.

Ein Modellsystem des Nickelzentrums von Shearer *et al* wurde mit zwei Thiolaten und einem Amid- und einem Aminostickstoff als Nickelliganden synthetisiert.⁹⁴ Obwohl die Nickel-Ligandenabstände dem Nickelzentrum der NiSOD ähneln, weist dieser Komplex keinerlei SOD-Aktivität auf.

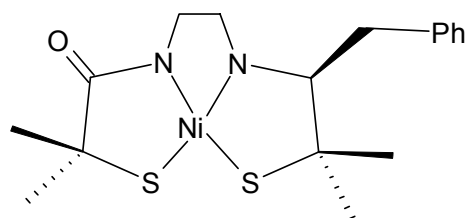


Abbildung 7.3: Modellsystem für das Nickelzentrum von Shearer *et al.*⁹⁴

Ein Grund dafür könnte die fehlende Beweglichkeit des Peptides sein. Aber auch die fehlende N-terminale Aminogruppe des His1 oder der fehlende fünfte Ligand zur Ni^{II}-Stabilisierung könnten Gründe für den Aktivitätsverlust sein.

Um den Einfluss des N-terminale Amins im Nonapeptid zu untersuchen, wurde ein Teil des synthetisierten Hexapeptids mit Benzoesäure am N-Terminus benzyliert (Abbildung 7.4).

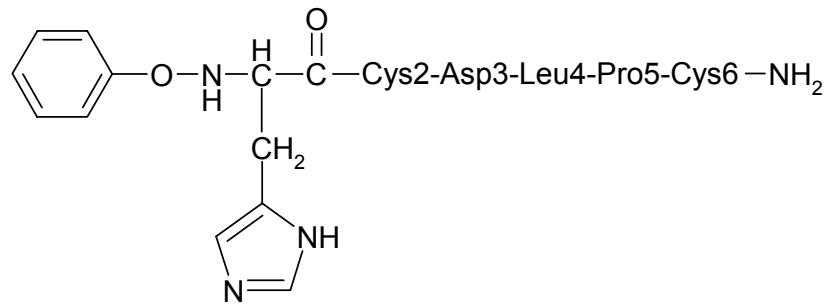


Abbildung 7.4: Benzylierung von His1

Durch die Benzylierung ist der N-Terminus geschützt. Standardmäßige Aktivitätsmessungen bei hohem Nickelüberschuss zeigten einen beinahe vollständigen Aktivitätsverlust des benzylierten Hexapeptides. Zudem wurden in ESI-MS-Experimenten nur sehr geringe Mengen an Nickel-Peptidkomplex nachgewiesen, trotz eines zehnfachen Überschuss an Nickel. Offensichtlich ist das Hexapeptid in dieser Form nicht in der Lage ein Ni^{II}-Ion zu binden, ein Umstand welcher den Verlust der SOD-Aktivität erklärt.

Der zusätzliche aromatische Ring könnte eine sterische Hinderung für die Ni^{II}-Komplexierung darstellen. Auch eine Veränderung in den elektronischen Eigenschaften der N-terminalen Aminogruppe durch die Benzylierung könnte die Komplexierungseigenschaften verschlechtern. Diese Untersuchung zusammen mit den Befunden von Shearer *et al.*⁹⁴ zeigen, dass eine freie N-terminale Aminogruppe einen essentiellen Strukturbestandteil des Biomimetikums darstellt.

7.2.2 Rolle der Seitenketten

Die Lösungsstruktur des Ni^{II}-Peptidkomplexes zeigt, dass die Seitenketten von Asp3, Leu4 und Val8 nach außen orientiert sind. Zudem sind Leu4 und Val8 im Enzym nicht streng konserviert, damit sind diese Aminosäuren wahrscheinlich nicht essentiell. Asp3 ist, wie bereits in Abschnitt 6.3 diskutiert, notwendig zur

7 Mechanistische Untersuchung

Stabilisierung der *cis*-Konformation von Pro5. Eventuell könnte die Seitenkette von Asp3 im Biominmetikum eine Rolle in der Protonenübertragung spielen. His1 hat im Nonapeptid keine entscheidende Auswirkung auf die Aktivität, wie durch den His1-Austausch in Abschnitt 7.1.1 gezeigt werden konnte.

Um diese Vermutungen zu überprüfen und ein möglichst kleines Modellsystem für die NiSOD zu schaffen, wurden zwei Hexapeptide synthetisiert, bei denen Gly7, Val8 und Tyr9 fehlten. Beim ersten Hexapeptid fand ein Austausch von Leu4 und His1 durch Ala statt, aber Asp3 blieb erhalten (Ala1-Cys2-Asp3-Ala4-Pro5-Cys6). Beim zweiten Hexapeptid wurde neben Leu4 und His1 auch Asp3 durch Ala ersetzt (Ala1-Cys2-Ala3-Ala4-Pro5-Cys6). Der Vorteil bei diesem kleinen Biomimetikum ist die Zugänglichkeit zu DFT-Methoden, während das Nonapeptid am Limit für DFT-Methoden liegt.

Die Synthese und Aufreinigung verlief wiederum problemlos. Ein Peptidgehalt im festen Zustand von etwa 75% wurde bestimmt und als Massenkorrektur wiederum in die weiteren Aktivitätsmessungen miteinbezogen.

Die Aktivitätsmessungen bei gleichen Bedingungen wie bei den anderen Modifizierungen ergaben eine SOD-Aktivität um 1250 U/ μ mol (siehe Abbildung 7.2). Bei beiden Hexapeptidvarianten (mit oder ohne Asp3) ist die Aktivität annähernd gleich und Asp3 besitzt keinen Einfluss auf die Katalyse. Mit 1250 U/ μ mol ist die Aktivität der Hexapeptide damit aber geringer als im Nonapeptid. Dies ist aber durch das Fehlen, des auch für das Biomimetikum, wichtigen Tyr9-Restes zu erwarten. Im Vergleich mit der Tyr9Ala-Mutante des Nonapeptids steigt die SOD-Aktivität dagegen leicht an. Eventuell haben die drei Aminosäuren Gly7, Val8, Ala9 im Nonapeptid leicht hemmende Eigenschaften, z.B. durch sterische Behinderung oder Beweglichkeit, die bei dem Hexapeptid fehlen. Ähnlich dem Nonapeptid ist His1 bei beiden Hexapeptidmutanten für eine hohe Aktivität nicht erforderlich. Auch die Seitenketten von Leu4 und Asp3 scheinen, wie erwartet, keinen Einfluss auf die SOD-Aktivität zu haben.

Mit dem Hexapeptid (Ala1-Cys2-Ala3-Ala4-Pro5-Cys6) konnte somit ein vorläufiges Minimalmodell mit nachgewiesener SOD-Aktivität für die NiSOD erstellt werden. Dies enthält nur die für die Katalyse essentiellen Strukturmerkmale und ist damit ein guter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen. Bei ersten ^1H -NMR-Messungen dieses Minimalmodells in DMSO- d_6 mit und ohne Nickelsalz zeigten sich wie beim Nonapeptid keine größeren Unterschiede zwischen diesen Spektren. Dies ist ein Hinweis, dass auch die Konformation im Hexapeptid trotz der Nickel-Komplexierung erhalten bleibt (Anhang, Abbildung A.6). Die 3D-Strukturaufklärung in Lösung ist der nächste Schritt in der Untersuchung des Hexapeptids, konnte aber im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführt werden.

7.3 Metallaustausch

Es gibt Anstrengungen an schwermetallresistenten Bakterien mit NiSOD-Enzymen, andere Schwermetalle (z.B. Cobalt) außer Nickel ins Metallzentrum einzubringen und dennoch ein aktives Enzym zu erhalten.⁷¹

Daher wurde überprüft, ob das Biomimetikum unter Umständen auch mit anderen Metallionen außer Nickel funktionsfähig ist. Das synthetisierte Minimalbiomimetikum (Ala1-Cys2-Ala3-Ala4-Pro5-Cys6) wurde dafür auf SOD-Aktivität in Gegenwart verschiedener Metallionen untersucht. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem XOD/Xanthin-System, wie in Abschnitt 6.3 beschrieben, bei einer Peptidkonzentration von 0,1 mM und einem Metallionenüberschuss vorgenommen. Folgende Metallsalze wurden verwendet: MnSO_4 , CoCl_2 , CrCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$, ZnSO_4 , PtCl_2 . Des Weiteren wurde mittels ESI-Messungen versucht, die Metall-Peptidkomplexe nachzuweisen. Einige Salze (ZnSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4) ließen sich nicht ausreichend in Methanol für die ESI-Experimente lösen und konnten daher nicht vermessen werden.

Die redoxinaktiven Metalle Platin und Zink zeigten erwartungsgemäß keine SOD-Aktivität. Diese sollten als Zugang für eine mechanistische Untersuchung der quadratisch-planaren Umgebung unter Ausschaltung der Redoxchemie dienen. Da die Pt^{2+} -Ionen im Gegensatz zu Ni^{II} -Ionen eventuell direkt mit NMR-Experimenten detektiert werden können, wurde versucht das Metallzentrum von Pt^{2+} -Peptidkomplexen mittels NMR zu untersuchen. Dabei konnten jedoch bisher keine Ergebnisse gewonnen werden. Die ESI-Experimente weisen zudem kaum Peptidkomplexe mit Platinionen nach, so dass es fraglich ist, ob überhaupt Pt^{2+} -Peptidkomplexe entstehen.

Weder Cobalt- sowie Chrom-Ionen allein noch im Komplex mit dem Peptid zeigen eine SOD-Aktivität. In den zugehörigen ESI-Messungen konnten jeweils nur Spuren an Komplexen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu inhibieren Eisen-, Mangan-, Kupferionen allein bei ausreichender Konzentration (etwa 0,1mM in der Küvette) die Reaktion vollständig. Somit erbrachte die Messung, der mit dem Hexapeptid komplexierten jeweiligen Metallionen keine verwertbaren Ergebnisse. Bei den ESI-Untersuchungen der jeweiligen Fe^{3+} - und Cu^{2+} -Peptidlösungen konnte nur mit Kupferionen größere Mengen an Peptidkomplex nachgewiesen werden (etwa 1/3).

Insgesamt konnten bei diesen ersten Untersuchungen keine Hinweise auf einen SOD-aktiven Metall-Peptidkomplex ohne Nickel erhalten werden.

8 Zusammenfassung

Superoxidradikal-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) entstehen als Nebenprodukt bei der natürlichen Energiegewinnung. Durch ihre hohe Reaktivität greift $O_2^{\cdot-}$ Zellbestandteile an und verursacht auf Dauer irreversible Schäden, was als ein Grund für Alterserscheinungen gesehen wird. Die Superoxiddismutasen wandeln das $O_2^{\cdot-}$ in weniger gefährliches Wasserstoffperoxid und Sauerstoff um. Damit sind die SODs ein wichtiger Teil des Schutzsystems in Organismen.

Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Charakterisierung eines minimalen biomimetischen Modells der Nickelsuperoxiddismutase (NiSOD). Die NiSOD wurde bisher in schwermetallresistenten Bakterien sowie einigen Cyanobakterien gefunden und besteht aus sechs homologen Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten besitzt ein nickelhaltiges Aktivzentrum, welches recht frei an die Untereinheit gebunden ist. Aufgrund seiner makrozyklischen Struktur wird das Aktivzentrum „Nickelhaken“ genannt. Dieser besteht aus neun, teils hoch konservierten Aminosäuren, wovon nur die ersten sechs Aminosäuren das Nickelion umgeben.

Dieser freistehende „Nickelhaken“ diente als Vorbild für ein synthetisches Biomimetikum (Nonapeptid). Die neun Aminosäuren des „Nickelhakens“ wurden artifiziell durch eine Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Das Nonapeptid wurde massenspektroskopisch sowie durch NMR-Experimente und Aminosäureanalysen charakterisiert. Der Nickel(II)-Komplex des Nonapeptids wurde massenspektroskopisch nachgewiesen.

Anschließende SOD-Aktivitätsuntersuchungen zeigten, dass dieses Nonapeptid eine ausgeprägte Aktivität in Anwesenheit von Nickel(II)-Ionen besitzt. Ein Vergleich mit der nativen NiSOD aus schwermetallresistenten *s. acidiscabies* zeigte, dass das Biomimetikum 20% der natürlichen Aktivität aufweist. Damit ist das Biomimetikum als ein hervorragendes Modellsystem für die NiSOD.

Die Aufklärung der 3D-Struktur des Nonapeptids in Lösung sowie dessen Nickel(II)-Komplexes erfolgte mit Hilfe von [$^1H, ^1H$]-ROESY-NMR-Experimenten und DFT-Rechnungen. Darauf aufbauend wurden Mutationsexperimente (Austausch einzelner oder mehrerer Aminosäuren durch Alanin) mit anschließender Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Damit konnte die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die katalytische Aktivität geklärt werden. Es zeigte sich, dass neben den Cystein2, Cystein6 (essentiell als Liganden) und Prolin5 (als wichtiger strukturgebender Faktor) nur noch Tyrosin9 einen größeren Einfluss auf die Aktivität besitzt. Aber auch ohne Tyrosin9 konnte ein funktionsfähiges Biomimetikum erhalten werden. Ausgehend von diesen Untersuchungen ließ sich ein funktionsfähiges Minimalmodell für die NiSOD auf Basis eines Hexapeptides entwickeln.

9 Experimenteller Teil

9.1 Material und Methoden

Chemikalien

Lösungsmittel wurden von Brenntag und Merck gekauft und vor der Verwendung destilliert. Geschützte Aminosäuren, Harze und Kopplungsreagenzien wurden von den Firmen NOVA, ORPEGEN und BACHEM gekauft. Alle anderen Chemikalien von ALDRICH/SIGMA/FLUKA bzw. Alfa Aesar bezogen.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschicht-Chromatographie erfolgte auf Merck-TLC Glasplatten (10 x 10 cm), die mit Kieselgel 60 beschichtet sind, welches Fluoreszenzindikator F254 beinhaltet. Als Laufmittel dienten folgende Lösungsgemische: (1) Propanol/konz. NH_3 7/3; (2) 1-Butanol/Eisessig/Wasser 48/18/24; (3) Pyridin/Essigester/Eisessig/Wasser 5/5/1/3. Zur Untersuchung der Platten wurden UV-Licht, Ninhydrin- und (nach Entfärben im Chlortopf) Chlor-Tolidin-Sprays verwendet.

Analytische HPLC

HPLC-Analysen erfolgten mit einer LC 10AT-Anlage (Fa. SHIMADZU) auf einer Vydac 218TP54-Säule (4,6 x 250 mm, 5 μm Korngröße, 30 nm Porengröße) unter den folgenden Elutionsbedingungen:

Eluent A: 0,1% TFA in H_2O Eluent B: 0,1% TFA in Acetonitril

Gradient: 0% - 60% Eluent B in 60 min

Flussrate: 1 ml/min Detektion: 220 nm

Präparative HPLC

Die HPLC-Aufreinigungen aller in dieser Arbeit hergestellten Peptidsequenzen erfolgte mit einer LC-8A-Anlage (Fa. SHIMADZU) auf einer Knauer EUROSPHERE 100 C18-Säule (32 x 250 mm, 5 μm Korngröße, 10 nm Porengröße) unter den folgenden Elutionsbedingungen:

Eluent A: 0,1% TFA in H_2O Eluent B: 0,1% TFA in 90% Acetonitril/ H_2O

Gradient: 10% - 60% Eluent B in 120 min

Flussrate: 10 ml/min Detektion: 220 nm

Massenspektroskopie

ESI-MS: Die Proben wurden in Methanol gelöst bzw. stark mit Methanol verdünnt und in einem MAT95XL-Gerät (Fa. Finigan) mit Sektorfeldanalysator vermessen.

MALDI-TOF: Die Matrixlösungen wurden aus einem Gemisch von Lösung A und Lösung B hergestellt. Es wurden jeweils 1 µl der hergestellten Matrixlösung und der Analytlösung gemischt und auf einer Trägerplatte aufgetragen. Die Platte wurde anschließend an der Luft getrocknet. Die Messungen erfolgten auf einem Bruker ultraflex TOF/TOF MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland), ausgerüstet mit einem Stickstofflaser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) und Flugzeitanalysator (positive reflectron mode, 20 kV, 56 grid, 0,15 guide wire, 100 ns delay).

Lösung A : 10 mg/ml α -Cyano-4-hydroxymethylsäure gelöst in 50% Acetonitril/H₂O und 0,1% TFA

Lösung B : gesättigte Lösung 4-Nitroanilin gelöst in 50% Acetonitril/H₂O

Analytlösung : 0,5 mM Peptidlösung (gelöst entweder in Wasser, DMSO, Methanol oder 5 mM Phosphatpuffer (pH 7,8))

ESR

Die ESR-Messungen wurden auf einem BRUKER EPS 300 ESR-Spektrometer (X-Band 9,4 GHz) vorgenommen. Für die Messungen wurde eine 1 mM Nickel-Peptidlösung in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) sowie DMSO hergestellt.

UV/Vis-Spektroskopie

Die spektroskopischen Messungen erfolgten auf einem Lambda 15 UV/VIS-Spektralphotometer (PERKIN-ELMER) mit Küvettenwechsler, Thermostat (Julabo F30) und enthaltender elektronischer Datenspeicherung und -auswertung (UV-Win Lab Software). Verwendet wurden Einweg Kunststoffküvetten (Greiner) des Typs HALBMICRO-Küvette oder Quarzküvetten.

Aminosäurenanalyse

Zur Vorbereitung der Proben für die Aminosäureanalysen (ASA) wird jeweils eine definierte Menge Peptid in eine Ampulle eingewogen und in 1 ml 6 N HCl gelöst. Die Ampulle wird mit Hilfe eines Bunsenbrenners verschlossen und mittels eines feuchten pH-Papiers wird überprüft, ob die Ampulle dicht ist. Anschließend wird die Lösung 24 h bei 110°C in einem Heizblock hydrolysiert. Nach der 24-stündigen Hydrolyse wird der Deckel der Ampulle mit einem Glasschneider entfernt und der Inhalt in eine Eppendorftube überführt. Die Lösung wird zentrifugiert und in einer Speed Vac eingeeengt. Das entstandene Pellet wird in

1 ml bidestillierten Wasser suspendiert, zentrifugiert und an der Speed Vac eingengt. Dieser Waschvorgang wird ein Mal wiederholt. Die Trennung und Detektion mit Ninhydrin (bei 570nm und 440nm) anhand eines geeichten Aminosäurestandards wurden auf einem Aminosäureanalysator LC3000 der Firma EPPENDORFBIOTRONIK durchgeführt.

Zirkular-Dichrosimus

Die CD-Spektren wurden auf einem Spektrometer Jasco J-710 gemessen. Die Schichtdicke der Quarzküvette betrug 1 mm. Die zu vermessende Nonapeptid-lösung wurde in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7) mit einer Nonapeptidkonzentration von 0,2 mM hergestellt. Die Nickelkonzentration bei der vermessenen Nickel-Peptidlösung betrug 0,4 mM.

NMR-Spektroskopie

Standard ^1H - und ^{13}C -NMR-Messungen wurde auf einem Avance 400 Gerät (Bruker) mit einer ^1H -Resonanzfrequenz von 400,2 MHz und einer ^{13}C -Resonanzfrequenz von 100,6 MHz gemessen. Die Restprotonen des deuterierten Lösungsmittels dienen als interner Standard. Als Lösungsmittel wurden DMSO und D_2O verwendet. Die Peptidkonzentration in den Lösungen betrug etwa 10 mM. Für die Messungen mit Nickelionen wurde zu der Peptidlösung Nickelsalz (NiCl_2 oder $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2$) in großem Überschuss gegeben. Die Temperatur während der Messungen betrug 289 K, falls nicht anders angegeben.

Alle 2D-Spektren zur Strukturaufklärung wurden auf einem Varian^{UNITY} INOVA 600 MHz und 750 MHz bei 298 K gemessen. Die Daten wurden mit dem VNMR⁹⁵ bearbeitet und mit XEASY⁹⁶ analysiert. Für die Protonenzuordnung wurden 2D DQF-COSY (*correlation spectroscopy*), TOCSY (*total correlation spectroscopy*) (40ms Spinlockzeit) und ROESY-Experimente durchgeführt. Die ROESY-Experimente wurden mit einer Mischzeit von 50, 150 und 200 ms ausgeführt. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus 90% Wasser/ D_2O sowie 100% D_2O verwendet. Die Peptidkonzentration betrug etwa 1 mM. Für Messungen mit Nickelionen wurde eine 1 mM Konzentration von [2:1]-Nickel-Peptidkomplex hergestellt, dazu wurde eine abgewogene Menge an NiCl_2 den Proben zugesetzt.

Für die lokale Konformationanalyse wurde das Found-Programm⁷⁶ genutzt, um aus den ermittelten Abstandseinschränkungen zusätzliche Einschränkungen für Diederwinkel zu bestimmen (Tabelle 9.1). Für die Distanzgeometrie-Optimierung wurde das Programm CYANA⁷⁷ verwendet. Dabei bleiben alle Abstände und Winkel zwischen den Atomen fixiert; nur die Diederwinkel besitzen Freiheitsgrade. Als Ausgangspunkt für die Berechnung dienten 100 Startstrukturen mit zufälligen Diederwinkeln. Für die Nickelbindestelle wurden zusätzlich sechs Distanzbeschränkungen festgelegt (Tabelle 9.2).

Tabelle 9.1: Aus der Konformationsanalyse berechnete Diederwinkelschränkungen und zusätzliche Diederwinkelbeschränkungen für das Metallzentrum

Winkel	Einschränkung (°)		Winkel	Einschränkung (°)	
1 HIS PSI	-1.0	3.0	4 LEU PSI	-205.0	85.0
2 CYSM PHI	-61.0	-59.0	5 PRO PSI	-295.0	-5.0
2 CYSM CHI1	-1.0	3.0	5 PRO PSI	-55.0	195.0
1 HIS CHI1	-325.0	-35.0	6 CYSS PHI	-315.0	-45.0
1 HIS CHI1	-175.0	85.0	6 CYSS PHI	-185.0	65.0
2 CYSM ^(a) CHI2	-25.0	25.0	6 CYSS PHI	-105.0	225.0
2 CYSM PSI	-265.0	-15.0	6 CYSS CHI1	-325.0	-15.0
2 CYSM PSI	-75.0	195.0	6 CYSS PSI	-85.0	195.0
3 ASP PHI	-315.0	-45.0	7 GLY PHI	-315.0	-45.0
3 ASP PHI	-185.0	65.0	7 GLY PSI	-125.0	125.0
3 ASP CHI1	-345.0	-15.0	8 VAL PHI	-115.0	-45.0
3 ASP CHI1	-215.0	95.0	8 VAL CHI1	45.0	75.0
3 ASP PSI	-85.0	115.0	8 VAL PSI	-45.0	5.0
4 LEU PHI	-315.0	-45.0	9 TYR PHI	-315.0	-45.0
4 LEU PHI	-175.0	65.0	9 TYR PHI	-185.0	65.0
4 LEU PHI	-95.0	225.0	9 TYR CHI1	35.0	265.0
4 LEU CHI1	-195.0	-75.0	9 TYR CHI1	-135.0	85.0
4 LEU CHI1	-115.0	215.0	9 TYR CHI2	-325.0	-35.0
4 LEU CHI2	45.0	185.0	9 TYR CHI2	-145.0	145.0
4 LEU PSI	75.0	165.0			

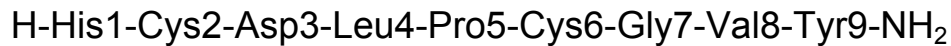
(a) M = nicht näher spezifiziertes Metallion

Tabelle 9.2: Distanzeinschränkungen für die Nickelbindstelle

Planare Beschränkungen für das Ni-Zentrum		
	Protonen	Abstände in Å
Metallion	1 HIS HN	1,9-2,10
Metallion	2 CYS HN	1,9-2,10
Metallion	6 CYS S	1,9-2,10
2 CYS S _γ	6 CYS S	3,2-3,40
6 CYS S _γ	1 HIS HN	2,4-2,60
6 CYS S _γ	2 CYS HN	3,8-4,00

9.2 Festphasenpeptidsynthesen

9.2.1 Synthese des Nonapeptids:



Schritt 1 Harzbeladung:

Herstellung von Harz-MBHA-Rink-Amid-Tyr(But)-Fmoc

300 mg Rink-Amid-MBHA-Harz (100-200 mesh; 0,73 mmol/g) werden in eine 4 ml Synthesespritze mit Frittenboden gefüllt und 30 min in destilliertem DMF gequollen. Danach werden 3 ml 20% Piperidin/DMF zugegeben und 15 min geschüttelt, um die Fmoc-Schutzgruppe abzuspalten. Dann wird das Harz zehnmals hintereinander 1 min lang mit je 2 ml DMF gewaschen. Anschließend werden je 4 äquivalente Fmoc-Tyr(But)-OH (0,73 mmol = 403 mg), HBTU (0,73 mmol = 332 mg) und HOBt (0,73 mmol = 134 mg) in 2 ml DMF gelöst. Es werden 8 eq. DIEA (1,46 mmol = 0,3 ml) zugesetzt und der gesamte Ansatz wird zum Harz gegeben. Nach 1 h Kopplungszeit (schütteln) wird die Lösung entfernt und das Harz dreimal mit je 2 ml DMF (1 min schütteln) gewaschen. Die Kopplungsprozedur wird mit dem gleichen Ansatz wiederholt. Danach wird sechsmal mit je 2 ml DMF gewaschen.

Schritt 2 Abspaltung der Fmoc-Gruppe:

Herstellung von Harz-MBHA-Rink-Amid-Tyr(But)-H

Die Fmoc-Schutzgruppe wird mit 3 ml 20% Piperidin/DMF (15 min schütteln) abgespalten. Die Piperidin/DMF-Lösung wird für die quantitative Beladungsbestimmung aufgehoben. Nach der Entfernung der Lösung von Harz wird das Harz zehnmals (1 min schütteln) mit je 2 ml DMF gewaschen.

Schritt 3 Quantitative Bestimmung der Beladung

Für die quantitative Bestimmung der Beladung wird eine Fmoc-Bestimmung durchgeführt. Die von der Fmoc-Abspaltung erhaltene Piperidin/DMF-Lösung wird in einen 10 ml Messkolben gegeben und mit 20% Piperidin-DMF-Lösung auf 10 ml aufgefüllt. Eine 1:1000 Verdünnung der Stammlösung wird angefertigt und dessen Extinktion im Spektrometer bei 301 nm gemessen. Mittels der Formel $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ kann die Beladung berechnet werden (E = Extinktion, c = Konzentration ε = Extinktionskoeffizient = $7000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, d = Küvettendicke). Die quantitative Fmoc-Bestimmung ergab eine Beladung von ca. 0,6 mmol/g.

9 Experimenteller Teil

Schritt 4 Kopplung der weiteren Aminosäuren (Ausnahme Cystein):

Beispiel: Herstellung von Harz-MBHA-Rink-Amid-Tyr(But)- Val-Fmoc

Je 4 eq. Fmoc-Val-OH (297mg), HBTU (332 mg) und HOBT (134 mg) werden in 2 ml DMF gelöst. Es werden 8 eq. DIEA (1,46 mmol = 0,3 ml) zugesetzt und der gesamte Ansatz zum Harz gegeben. Nach 1 h schütteln wird das Harz dreimal mit DMF (je 1min schütteln) gewaschen und die Kopplung mit dem gleichen Ansatz wiederholt. Danach wird sechsmal mit DMF (je 1min schütteln) gewaschen. Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe mit 3 ml 20% Piperidin/DMF (je 15 min schütteln) abgespalten. Nach dem Entfernen der Piperidin/DMF-Lösung wird das Harz zehnmal mit 2 ml (je 1min schütteln) DMF gewaschen.

Die restlichen Aminosäuren werden nach gleichem Schema gekuppelt, einzige Ausnahme ist Cystein (Fmoc-Cys(Trt)-OH).

Schritt 5. Kopplung von Fmoc-Cys(Trt)-OH

Bei der Kopplung von Fmoc-Cys(Trt)-OH unter Verwendung von DIEA als Base kann es zu Enantiomerisierung kommen. Daher wird Diisopropylcarbodiimid (DIC) stattdessen verwendet. Es werden 4 eq. Fmoc-Cys(Trt)-OH (513 mg) in DMF gelöst. 8 eq. (0,27 ml) DIC werden zugesetzt und die Lösung sofort zum Harz gegeben. Nach 1 h schütteln wird die Lösung entfernt und das Harz dreimal mit DMF gewaschen und die Kopplung mit dem gleichen Ansatz wiederholt. Danach wird sechsmal 2 ml mit DMF gewaschen und die Fmoc-Abspaltung erfolgt wie in Schritt 2 beschrieben.

Schritt 6. Abspaltung vom Harz: Herstellung von
H-1His-2Cys-3Asp-4Leu-5Pro-6Cys-7Gly-8Val-9Tyr-NH₂

Nach der Kopplung der letzten Aminosäure (Fmoc-His(Trt)-OH) und Abspaltung von Fmoc wird das Harz sechsmal mit 2 ml (je 1min schütteln) DMF, dann sechsmal mit 2 ml (je 1min schütteln) Dichlormethan gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

Eine Lösung von 18 ml 95%iges TFA (Trifluoressigsäure) und 1 ml TIS (Triisopropylsilan) pro 1 g des getrockneten Harzes dem Harz zugesetzt. Nach 3 h Schütteln hat sich das Peptid von Harz abgespalten. Anschließend wird die Lösung mit dem Peptid vom Harz abfiltriert. Das Harz wird mit 0,5 ml TFA nachgewaschen. Das gesamte Filtrat wird in 20 ml kalten Diethylether eingetropf. Die erhaltene Suspension wird zentrifugiert und der Ether vorsichtig dekantiert. Das ausgefallene Peptid wird dreimal mit jeweils 3 ml kalten Ether gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels semipräparativer HPLC.

Tabelle 9.3: Verwendete Substanzen für die Peptidsynthese bezogen auf ein Rink-Amid-MBHA-Harz mit einer Beladung von 0,73 mmol/g und einer eingesetzten Menge von 300 mg

Substanzbezeichnung	Stoffmenge/ Dichte	Massen	Volumen
Fmoc-Tyr(tBut)-OH	459,55 g/mol	403 mg	
Fmoc-Val-OH	339,39 g/mol	297 mg	
Fmoc-Gly	297,31 g/mol	260 mg	
Fmoc-Cys(trt)-OH	585,73 g/mol	513 mg	
Fmoc-Pro-OH	337,4 g/mol	290 mg	
Fmoc-Leu-OH	353,43 g/mol	309 mg	
Fmoc-Asp(tBut)-OH	411,46 g/mol	360 mg	
Fmoc-His(trt)-OH	619,7 g/mol	543 mg	
Fmoc-Ala-OH	329,4 g/mol	289 mg	
HBtU	379,25 g/mol	332 mg	
HOBt	153,1 g/mol	134 mg	
Benzoessäureanhydrid	226,2 g/mol	500 mg	
DIPEA	129,25 g/mol; 0,755 g/ cm ³		300 µl
DIC	126,2 g/mol; 0,815 g/cm ³		270 µl

Nonapeptid

Sequenz: H-His1-Cys2-Asp3-Leu4-Pro5-Cys6-Gly7-Val8-Tyr9-NH₂

Summenformel: C₄₃· H₆₄, N₁₂, O₁₂, S₂

Ausbeute Rohpeptid : 90%

Ausbeute nach HPLC : 60%

Masse berechnet: 1005,19 g/mol

Masse gefunden (ESI): 1006,1 g/mol [M+H]⁺

HPLC Retentionszeit: 29,5 min

Peptidgehalt (ASA): 50%

9 Experimenteller Teil

Protonenkoppeltes ^{13}C -Spektrum des Nonapeptides:

δ (ppm) = 172,91; 171,55; 171,47; 170,41; 170,35; 170,04; 169,98; 169,30;
 168,74; 167,26 (9 C_1 aller AS und C_4 Asp); 155,75 (C_7 Tyr);
 134,36 (C_6 His); 129,99 (C_5 Tyr); 127,89; 126,51 (C_4 His, Tyr);
 118,15 (C_5 His); 114,85 (C_6 Tyr);
 59,40; 57,88; 55,09; 55,05; 54,16; 51,20; 49,58; 48,88 (8 C_2H aller
 Aminosäuren);
 46,71 (C_5 Pro); 42,18 (C_2H_2 Gly); 40,07 (C_3 Leu, DMSO);
 36,66; 35,95 (C_3 Asp, Tyr); 30,41; 30,36 (C_3 Pro, Val); 28,76 (C_3
 His);
 26,30; 26,14 (2^*C_3 Cys); 24,51 (C_4 Pro); 23,97 (C_4 Leu);
 23,20; 21,42 (C_5, C_6 Leu); 19,08; 17,80 (C_4, C_4' Val).

Nomenklatur: C_1 ist immer der C-Terminus der jeweiligen Aminosäure, die anderen Kohlenstoffatome werden der Reihe nach durchnummeriert (siehe Abbildung 9.1).

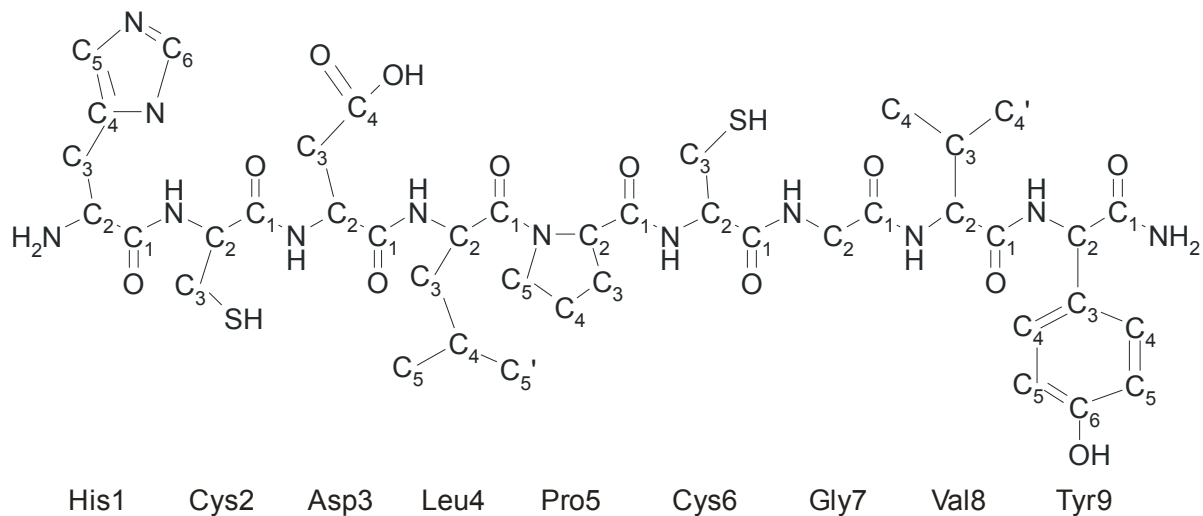


Abbildung 9.1: Bezeichnung der C-Atome in den Aminosäuren für die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale

9.2.2 Synthese der Nonapeptidmutanten His1Ala und Tyr9Ala

Die Herstellung aller Nonapeptidmutanten erfolgt analog zum Nonapeptid. Fmoc-His(trt)-(OH) [His1] wurde für die His1Ala-Mutante durch Fmoc-Ala-(OH) ersetzt. Fmoc-Tyr(tBut)-OH [Tyr9] für die Tyr9Ala-Mutante wurde durch Fmoc-Ala-(OH) ersetzt. Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgte analog zum Nonapeptid.

His1Ala-Mutante

Sequenz: H-Ala1-Cys2-Asp3-Leu4-Pro5-Cys6-Gly7-Val8-Tyr9-NH₂

Summenformel: C₃₇, H₆₀, N₁₂, O₁₁, S₂

Masse berechnet: 939,13 g/mol

Masse gefunden (ESI): 939,3 g/mol [M+H]⁺

HPLC Retentionszeit: 30,9 min

Peptidgehalt (ASA): 83%

Tyr9Ala-Mutante

Sequenz: H-His1-Cys2-Asp3-Leu4-Pro5-Cys6-Gly7-Val8-Ala9-NH₂

Summenformel: C₄₀, H₆₂, N₁₀, O₁₂, S₂

Masse berechnet: 913,09 g/mol;

Masse gefunden (ESI): 913,3 g/mol [M+H]⁺

HPLC Retentionszeit: 29,1 min

Peptidgehalt (ASA): 84%

9.2.3 Synthese der Hexapeptide:



Die Hexapeptidssynthese erfolgten analog zum Nonapeptid. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Synthese mit Fmoc-Cys(Trt)-OH begann. Für die Hexapeptid (Asp3)-Mutante wurde die Aminosäuren His1 und Leu4 bei der Synthese durch Alanin ersetzt. Bei der Hexapeptid (Asp3Ala)-Mutante wurde zusätzlich dazu noch Asp3 durch Alanin ersetzt. Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgte wieder analog zum Nonapeptid.

Hexapeptid

Sequenz: H-His1-Cys2-Asp3-Leu4-Pro5-Cys6-NH₂

Summenformel: C₂₇, H₄₃, N₉, O₈, S₂

Masse berechnet: 685,83 g/mol;

Masse gefunden (ESI): 686,1 g/mol [M+H]⁺

HPLC Retentionszeit: 28,3 min

Hexapeptid (Asp3)-Mutante

Sequenz: H-Ala1-Cys2-Asp3-Ala4-Pro5-Cys6-NH₂

Summenformel: C₂₁, H₃₅, N₇, O₈, S₂

Masse berechnet: 577,7 g/mol;

Masse gefunden (ESI): 578,1 g/mol [M+H]⁺

HPLC Retentionszeit: 19,1 min

Peptidgehalt (ASA): 77%

Hexapeptid (Asp3Ala)-Mutante

Sequenz: H-Ala1-Cys2-Ala3-Ala4-Pro5-Cys6-NH₂

Summenformel: C₂₀, H₃₅, N₇, O₆, S₂

Masse berechnet: 533,7 g/mol;

Masse gefunden (ESI): 534,1 g/mol [M+H]⁺

HPLC Retentionszeit: 23,5 min

Peptidgehalt (ASA): 74%

9.2.4 Benzoylierung der N-terminalen Aminogruppe von His1

Das Hexapeptid wird benzoyliert bevor es vom Harz abgespalten wird. Dazu wird das Harz nach der Kopplung der letzten Aminosäure mit 3 ml 20% Piperidin/DMF (15 min schütteln) versetzt, um die Fmoc-Schutzgruppe abzuspalten. Nach dem Entfernen der Lösung wird zehnmal hintereinander mit je 2 ml DMF (1 min schütteln) gewaschen. 5 eq (0,5 g) Benzoesäureanhydrid und 15 eq (0,56 ml) DIEA werden in 2 ml DMF gelöst und zum Harz gegeben. Nach 30 min schütteln wird die Lösung entfernt und dieser Benzoylierungsschritt wiederholt. Anschließend wird sechsmal mit 2 ml (1 min schütteln) DMF und sechsmal mit 2 ml (1 min schütteln) Methanol gewaschen. Das Harz wird im Vakuum getrocknet und das Peptid anschließend (wie in Abschnitt 9.2.1 Schritt 6 beschrieben) abgespalten.

Benzoyliertes Hexapeptid

Sequenz: Bz-Ala1-Cys2-Asp3-Ala4-Pro5-Cys6-NH₂

Enthaltene Atom: C₃₄, H₄₇, N₉, O₉, S₂

Masse berechnet: 789,94 g/mol

Masse gefunden (ESI): 790,2 g/mol [M+H]⁺

HPLC Retentionszeit: 32,4 min

9.3 Bestimmung der SOD-Aktivität

9.3.1 Qualitativer Aktivitätstest

Superoxidradikal-Anionen (O₂^{•-}) werden mit Hilfe eines Riboflavin/TMEDA-Systems generiert. Die O₂^{•-} reagieren sowohl mit dem Farbstoff Nitroblue Tetrazolium (NBT), welcher zu Formazan reduziert wird (tiefblauschwarze Färbung der Lösung). Ist eine SOD-aktive Substanz vorhanden, konkurriert diese mit NBT um die O₂^{•-} und die Lösung bleibt hell.

Stammlösungen: NBT (2 mg in 1 ml Aqua dest.)

Riboflavin/TMEDA (2,6 mg Riboflavin, 1,06 ml TMEDA in 250 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,8).

Für die Reaktion (bei RT) werden zu 0,5 ml einer 1 mM Peptidlösung (in destilliertem Wasser) 0,5 ml einer 2 mM NiCl₂-Lösung gegeben, in den Kontrollen werden entsprechend Peptid bzw. Ni-Salz durch destilliertes Wasser ersetzt. Anschließend wird 0,1 ml NBT-Lösung zugegeben. Der Ansatz wird dann 15 min im Dunkeln inkubiert. Danach wird 0,1 ml Riboflavin/TEMED zugegeben und nach weiteren 15 min Inkubation im Dunkeln wird die Reaktion durch Licht (Lichttisch, Scanner) ausgelöst. Eine Blaufärbung zeigt die Umsetzung von NBT an und somit auf eine fehlende SOD-Aktivität. Bleibt die Färbung aus, ist dies ein Hinweis auf SOD-Aktivität.

Eine weitere Möglichkeit eines qualitativen Nachweises für SOD-Aktivität besteht in der Verwendung von KO₂ als Radikalquelle. Analog zum Riboflavin/TMEDA-System wird eine NBT-Lösung zum Nachweis verwendet. Die Probelösung (1 ml einer 1 mM des [2:1] Nickel-Peptidkomplexes in destilliertem Wasser) wird mit 0,1 ml der NBT-Stammlösung gemischt. Zu dieser Lösung wird eine geringe Menge KO₂ (Spatelspitze) zugegeben. Färbt sich die Lösung tiefblau, liegt keine SOD-Aktivität vor. Bleibt die Lösung farblos besitzt die Probe SOD-Aktivität. Als Kontrolle dient eine NBT-Lösung.

9.3.2 McCord/Fridovich-Test

Die quantitative Messung der Superoxid-Dismutase-Aktivität erfolgt nach folgendem Prinzip: Xanthinoxidase oxidiert Xanthin und erzeugt dabei $O_2^{\cdot-}$. Diese reduzieren Cytochrom C oder NBT, was im UV/Vis-Spektrometer bei 550nm durch eine Erhöhung der Extinktion verfolgt werden kann. Bei Superoxid-Dismutase-Aktivität einer zugesetzten Substanz werden $O_2^{\cdot-}$ abgefangen. Die Reduktion des Cytochrom C wird dadurch gehemmt. Im UV/Vis-Spektrum ist dies durch eine Schwächung des Anstiegs messenbar.⁶⁴

Stammlösungen: 50 mM Phosphatpuffer pH 7,8;
Cytochrom C (Sigma, *Saccachomyces cerevisiae*) (26 mg/10 ml in 50 mM Phosphatpuffer),
NBT (1,5 mg in 1 ml 50 mM Phosphatpuffer),
Xanthin (3 mg/25 ml in 50 mM Phosphatpuffer vorher mit drei Tropfen NaOH auflösen),
Xanthin-Oxidase (40 units/4,2 ml; 80 µl Enzymlösung zu 9ml 50 mM Phosphatpuffer, frisch ansetzen)

Für die Bestimmung der Kontrollgerade werden in einer 1 cm-Küvette (Halbmikro, Plastik) zu 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,8) 75 µl Cytochrom C (1 µM in Küvette) und 100 µl Xanthin (5,5 µM in der Küvette) gegeben. Kurz vor dem Start der Messung werden dazu 250 µl Xanthinoxidase gegeben und kurz geschüttelt. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 550 nm bei 27°C für 60 Sekunden (Lambda 15 UV/VIS-Spektralphotometer (PERKIN-ELMER). Der Anstieg wird nur während der linearen Phase genommen. Für die Ermittlung der Superoxiddismutase-Aktivität werden 100 µl Puffer durch 100 µl Probelösung mit dem Nickel-Peptid-Komplex in gewünschten Konzentrationen ersetzt.

Der gleiche Test kann auch mit NBT (Nitoblu Tetrazolium) anstatt mit Cytochrom C als Substrat für die Reduktion durch $O_2^{\cdot-}$ verwendet werden. Zur Lösung in der Küvette kommt 75 µl NBT dazu statt Cytochrom C (0,1 mM Konzentration in der Küvette). Die Aktivität der Superoxiddismutase wird so definiert, dass eine Unit des Enzyms der halblimitierten Reduktion des Cytochrom C bzw. NBT entspricht.

$$\text{Aktivität} = \frac{m(\text{Kontrolle}) - m(\text{Probe})}{\frac{m(\text{Kontrolle})}{2}} \quad 9.3.2.1$$

9.4 Nickeltitration

Zur Bestimmung der benötigten Nickel-Konzentration für eine vollständige Komplexierung des Peptides wurde ein abgewandelter Ellman-Test⁵⁷ verwendet. Dabei wird ein Wellenlängenscan (380–600 nm) von 1 ml einer 1 mM Peptidlösung [0,1 mM Phosphatpuffer (pH 7,8)] in einer Quarzküvette bei Raumtemperatur vorgenommen. Die Lösung wird mit 10 µl Portionen einer wässrigen 10 mM Nickelsalzlösung titriert. Zwischen jeder Zugabe wird einen Wellenlängenscan angefertigt. Dabei nimmt die Extinktion um 458 nm sichtbar durch die Ausbildung von Ni-S-Bindungen zu. Ist eine vollständige Komplexierung erreicht, bleibt der aus $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ zu errechnende Extinktionskoeffizient konstant. Dabei ist E die Extinktion, ε der Extinktionskoeffizient, c die Peptidkonzentration und d die Schichtdicke der Küvette.

9.5 Quantenchemische Berechnungen

Für alle Berechnungen (bis auf die NBO-Analyse) wurde das Programmpaket TURBOMOLE⁸⁵ verwendet. Die Vorooptimierung wurde mit einer *Split-Valence*-Basis [SV(P)]⁸¹ mit Polarisationsfunktionen an allen Atomen außer Wasserstoff durchgeführt. Für die anschließende Strukturoptimierung wurde eine *Triple-Zeta-Split-Valence*-Basis (TZVP) mit Polarisationsfunktionen an allen Atomen verwendet. Für die DFT-Rechnungen wurden folgende Funktionale genutzt: BP86^{79,80}, B3LYP*⁹¹. Alle Berechnungen mit dem BP86-Funktional verwendeten die *Multiopole Accelerated Resolution of Identity Approximation* (MARI-J).⁸²⁻⁸⁴ Zur Simulation von Lösungsmittelleffekten wurde *conductor-like screening model* (COSMO)⁸⁶ genutzt, welches in TURBOMOLE integriert ist. Für die Berechnung der *shared electron numbers*⁹⁰ wurde das TURBOMOLE-Modul MOLOCH verwendet. Für die NBO-Analyse⁸⁹ mit GAUSSIAN03⁹⁷ wurde eine Singlepoint-Rechnung mit dem Programmpaket GAUSSIAN03 für eine mit TURBOMOLE optimierte Struktur durchgeführt. Anschließend wurde die NBO-Rechnung mit einer NBO5.G ausgestattete GAUSSIAN03-Version durchgeführt.

SEN-Analyse

Die „two center shared electron numbers“ σ_{SEN} wurde zur Abschätzung der Stabilisierungsenergien der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung verwendet. σ_{SEN} kann für die betrachtete Wasserstoffbrücke aus einer Orbitalanalyse entnommen werden. Mit σ_{SEN} und einem empirisch gefitteten Faktor λ kann die intramolekulare Energie der Wasserstoffbrückenbindung mit folgender Formel berechnet werden:

$$E_{HB} = \lambda \cdot \sigma_{SEN} \quad 9.5.1$$

Zur Bestimmung des empirischen Faktors λ wird wie folgt vorgegangen:

Zuerst wird die Energie von zwei Molekülen (AH, B) einzeln berechnet. Anschließend wird die Energie bestimmt, wenn beide Moleküle interagieren (AH-B). Diese Energie (E_{AH-B}) beinhaltet zusätzlich zur Energie der beiden Moleküle die Wasserstoffbrückenbindungs-Energie. Die Differenz aus den Energien [$E_{AH-B} - (E_{AH} + E_B)$] ergibt somit die Energie der Wasserstoffbrückenbindung (E_{HB}). Weiterhin wird σ_{SEN} für das wechselwirkende System bestimmt. λ ist damit die verbleibende unbekannte Größe in Gleichung 9.1 und kann über eine lineare Regression einer Reihe von Standardverbindungen bestimmt werden (Abbildung 9.2). Aus dem gewählten Testsatz (Tabelle 9.4) wurde λ mit 345 kJ/mol bestimmt.

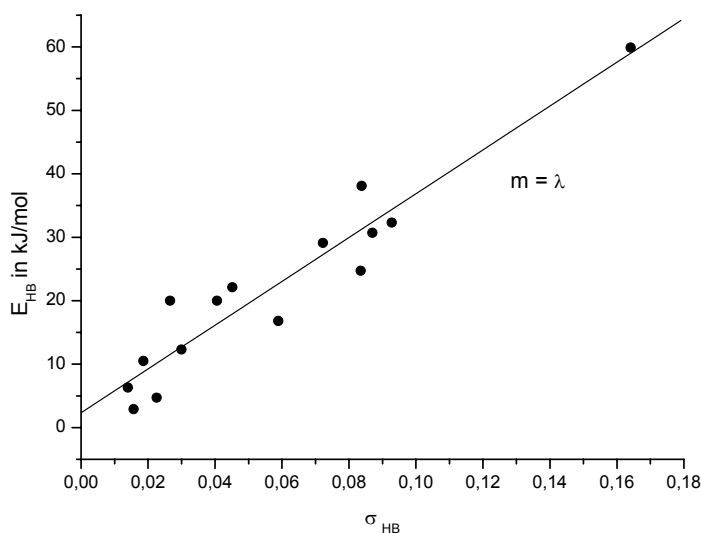


Abbildung 9.2: „two center shared electron numbers“ (σ_{SEN}) verschiedener Wasserstoffbrücken mit jeweils berechneten Energien (E_{HB}). Der Anstieg m ist gleich der Faktor $\lambda = 345$ kJ/mol

Tabelle 9.4: Berechnete Bindungsenergien der Wasserstoffbrücken E_{HB} in kJ/mol und „two center shared electron numbers“ σ_{HB} , rechts: Protonendonor, links: Protonenakzeptor

	E_{HB}	σ_{HB}
$H_2PH \cdots NH_2CH_3$	2,9	0,0157
$HSH \cdots SH_2$	4,7	0,0226
$HSH \cdots OCH_2$	6,3	0,0140
$HOH \cdots OCH_2$	10,5	0,0186
$CH_3HNH \cdots NH_2CH_3$	12,3	0,0300
$HSH \cdots NH_3$	16,8	0,0589
$FH \cdots FH$	20,0	0,0406
$H_2NH \cdots NH_3$	20,0	0,0266
$HOH \cdots OH_2$	22,1	0,0452
$FH \cdots SH_2$	24,7	0,0835
$HOH \cdots NH_3$	29,1	0,0722
$HOH \cdots NH_2CH_3$	30,7	0,0870
$HOH \cdots NH_2NH_2$	32,3	0,0928
$FH \cdots OH_2$	38,1	0,0838
$FH \cdots NH_3$	59,9	0,1641

Anhang

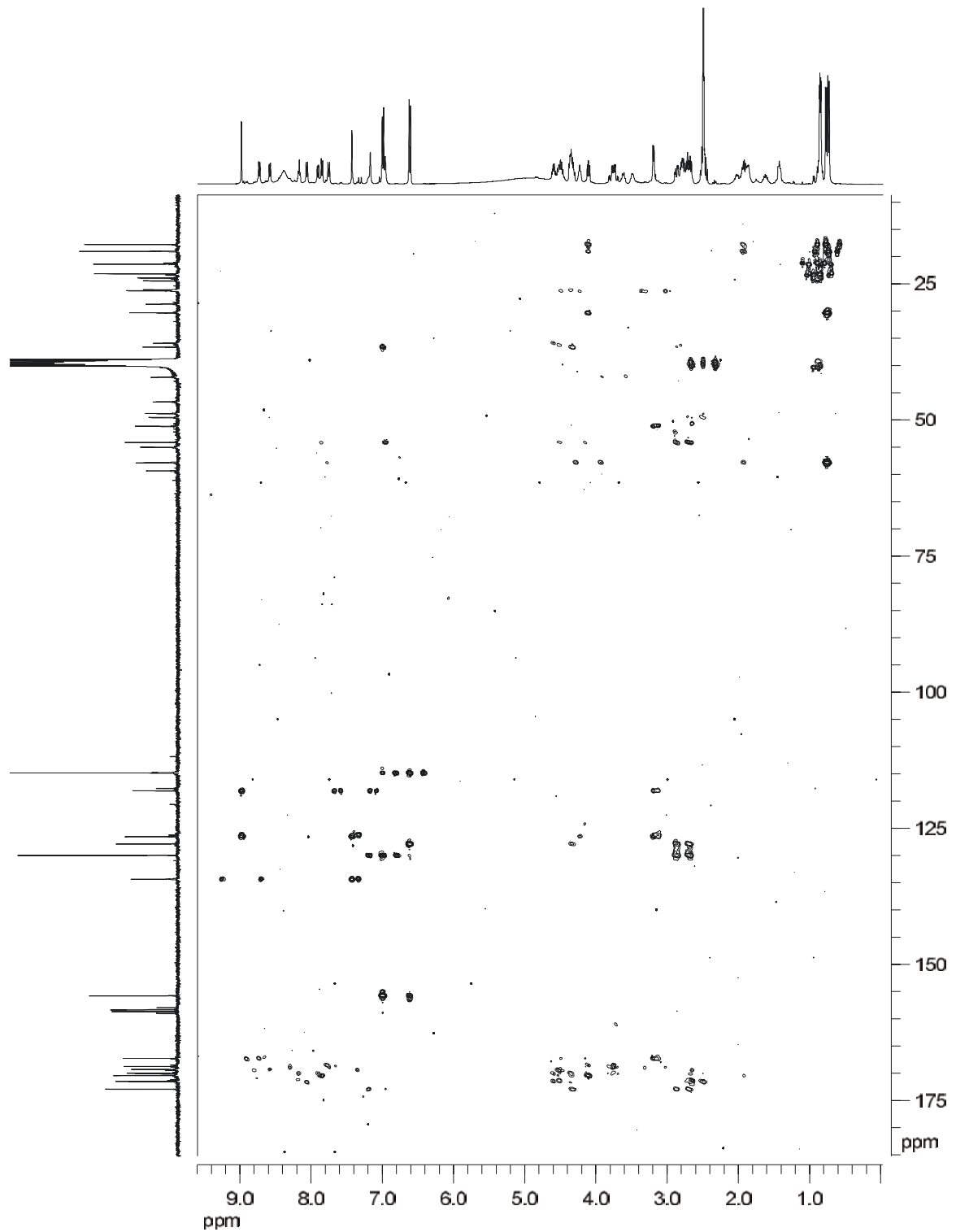


Abbildung A.1: [^1H - ^{13}C]-HMBC-Spektrum des Nickel-Nonapeptidkomplexes in DMSO- d_6 bei Raumtemperatur (x-Achse ^1H , y Achse ^{13}C)

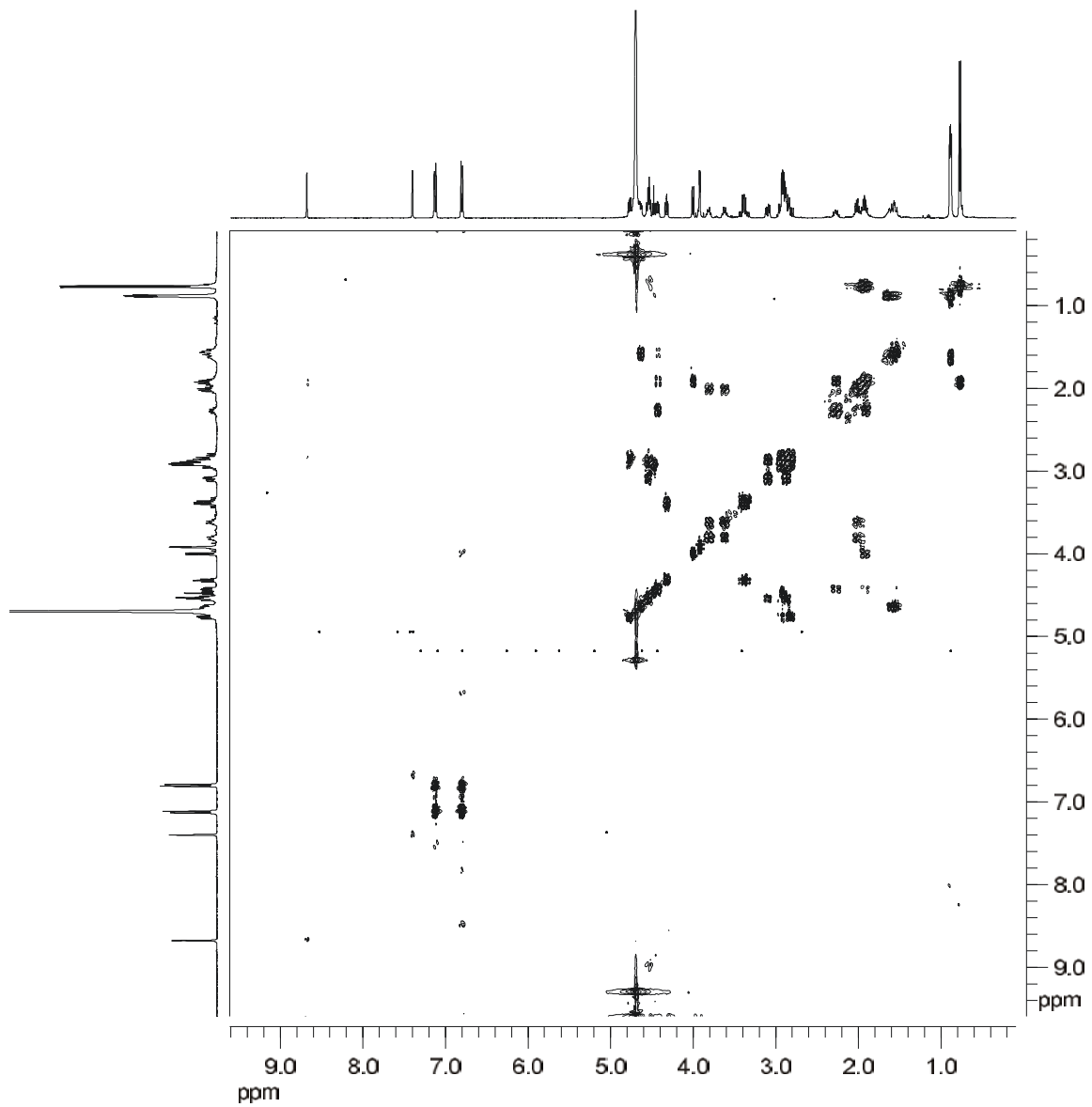


Abbildung A.2: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum des Nonapeptids in D_2O bei Raumtemperatur

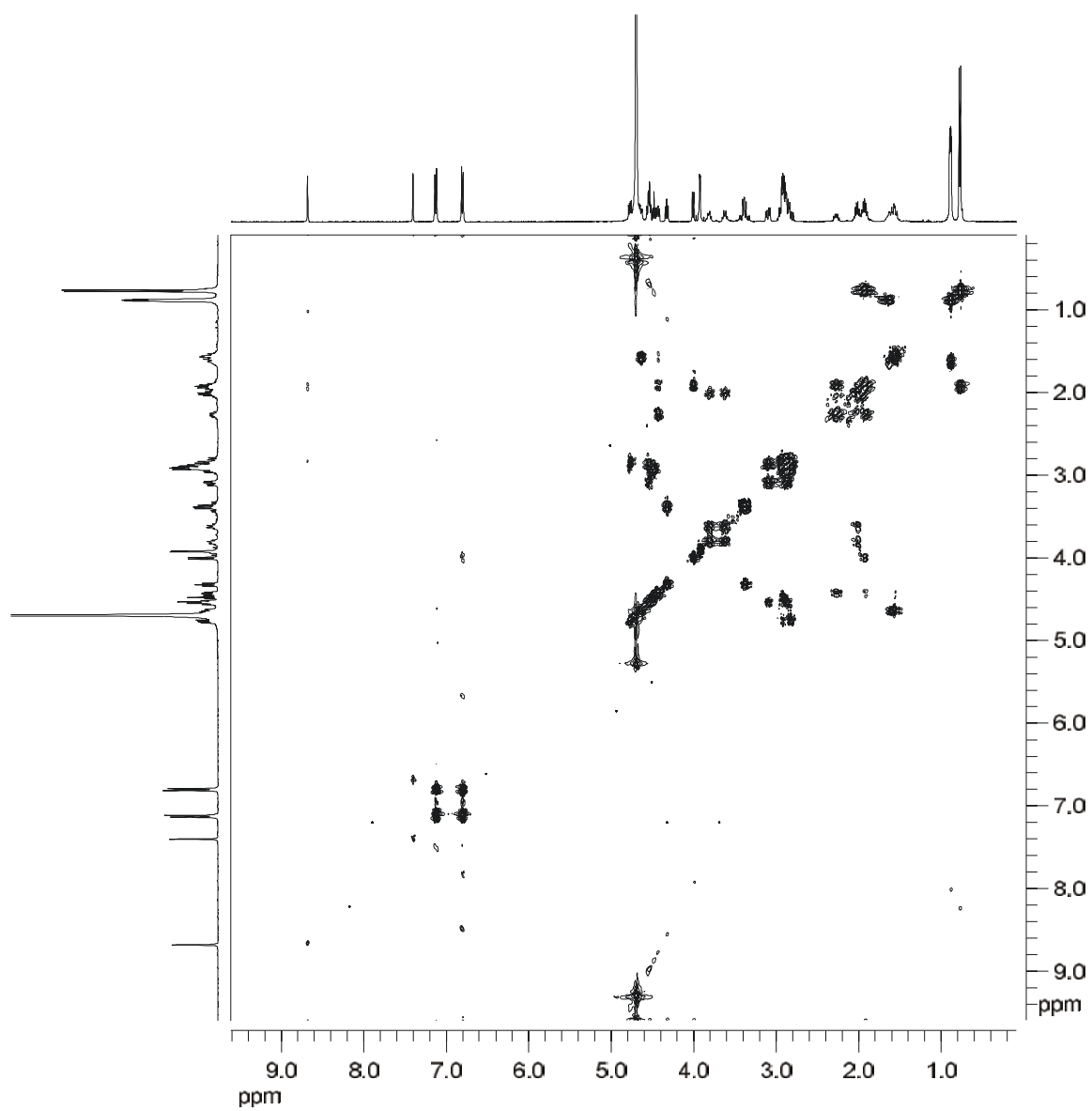


Abbildung A.3: [^1H - ^1H]-COSY-Spektrum des Nickel-Nonapeptidkomplexes in D_2O bei Raumtemperatur

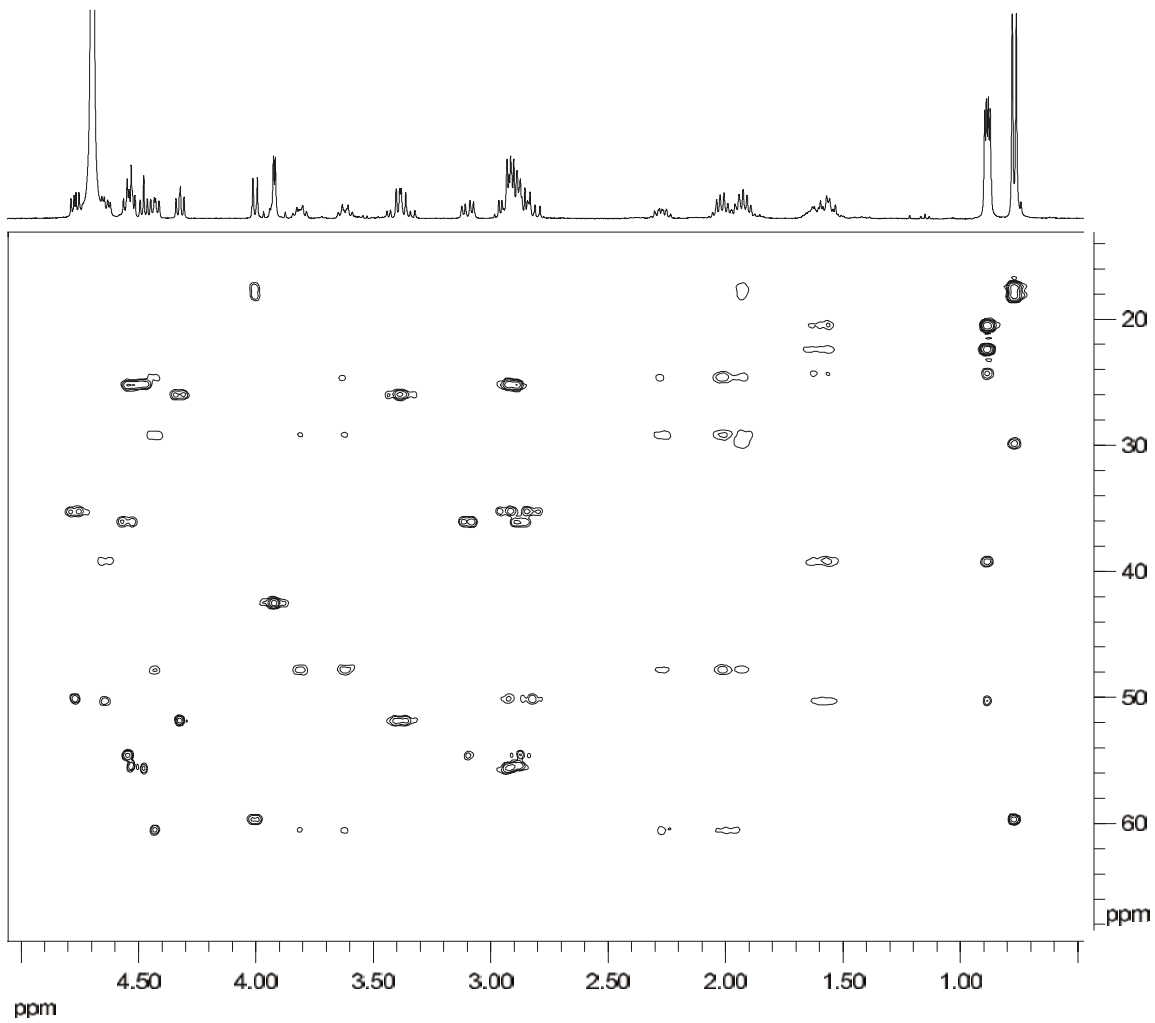


Abbildung A.4: Ausschnitt aus dem [^1H - ^{13}C]-HSQC-TOCSY-Spektrum des Nickel-Nonapeptidkomplexes in D_2O bei Raumtemperatur (x-Achse ^1H , y Achse ^{13}C)

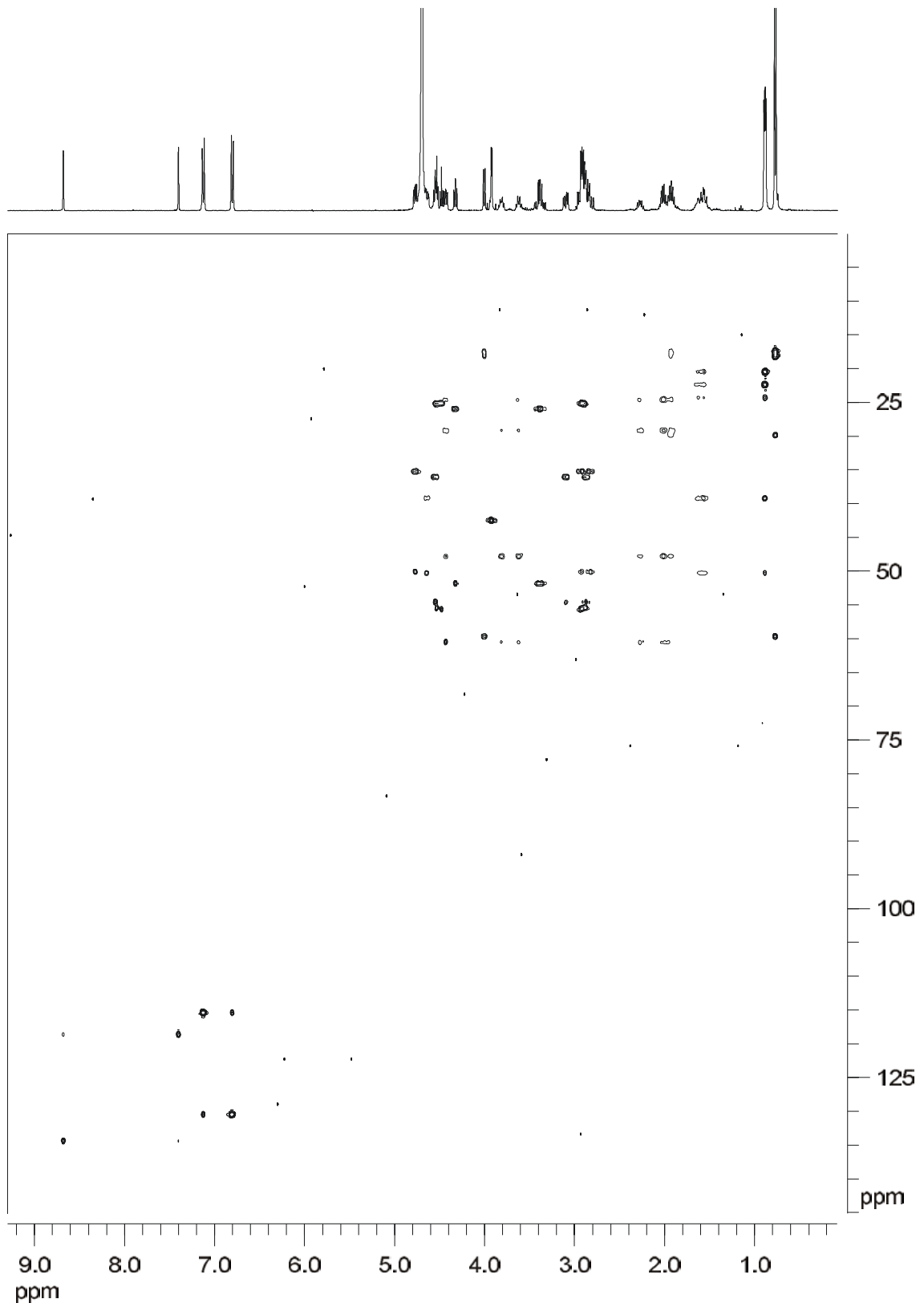


Abbildung A.5: gesamtes [^1H - ^{13}C]-HSQC-TOCSY-Spektrum des Nickel-Nonapeptidkomplexes in D_2O bei Raumtemperatur (x-Achse ^1H , y Achse ^{13}C)

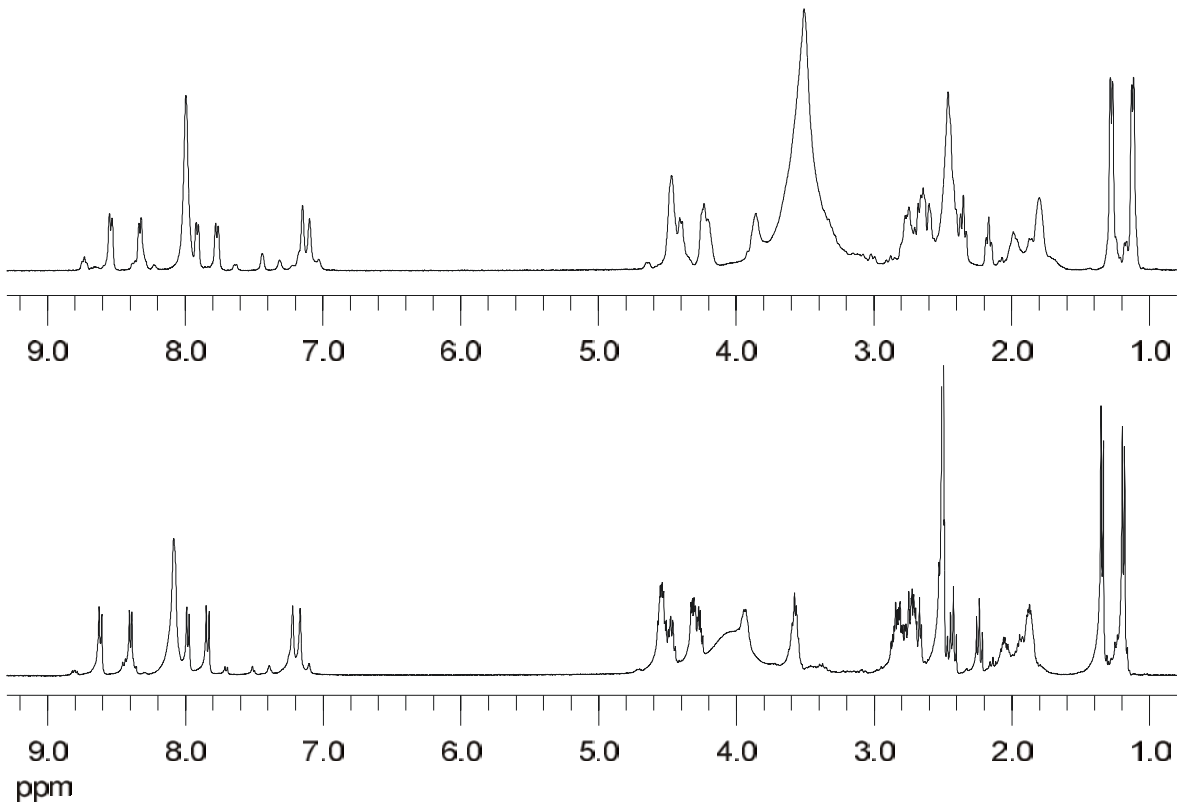


Abbildung A.6: ¹H-Spektrum des Hexapptids in DMSO bei Raumtemperatur; unteres Spektrum ohne Nickelperchlorat [Ni(ClO₄)₂] Hexaaqua, oberes Spektrum mit Überschuss an Ni(ClO₄)₂; die Verbreiterung des Signals im oberen Spektrum bei 3,5 ppm ist durch das in Ni(ClO₄)₂ enthaltene Wasser erklärbar

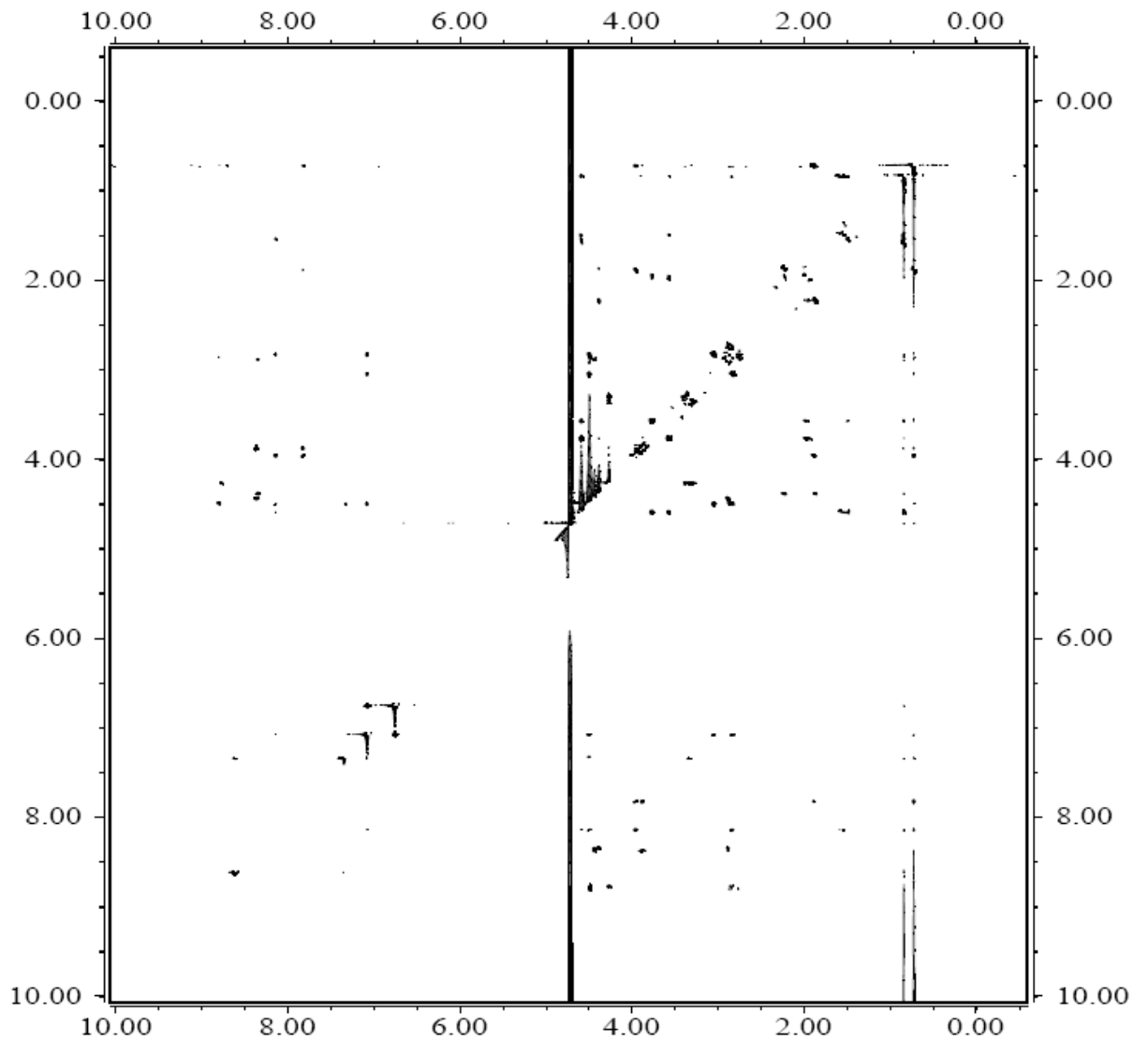


Abbildung A.7: komplettes [^1H , ^1H]-ROESY-Spektrum des Nonapeptids (Einheit ppm), in 90% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ bei Raumtemperatur aufgenommen

Abkürzungsverzeichnis

Viele der Abkürzungen ergeben sich aus englischen Begriffen. Da die deutsche Übersetzung meistens keinerlei Aufschluss über die Herkunft der Abkürzung liefert, wurden sie in den meisten Fällen weggelassen.

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
B3LYP*	Dichtefunktional ähnlich dem B3LYP-Funktional mit angepasstem exaktem Hartree-Fockk-Austauschterm für Spinsplitting der Übergangsmetallkomplexe
BP86	Dichtefunktional; Becke88-Austausch- und Perdew86- Korrelationsterm
COSMO	<i>conductor-like screening model</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
Cys	Cystein
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylendiamin
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DMF	N,N Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DQF	<i>double quantum filtered</i>
ESI	<i>elektrospray ionisation</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
Fmoc	9-Fluorenylmethyl Carbamat
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HBTU	O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate
His	Histidin
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>

Abkürzungsverzeichnis

HOBT	N-Hydroxybenzotriazole Hydrate
HP	Hexapeptid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation - time of flight</i>
MARI-J	<i>multipole accelerated resolution of identity approximation</i>
MS	Massenspektroskopie
NBO	<i>natural bond orbital</i>
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
pdb	Dateien aus der Protein-Daten-Bank
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
ROE	<i>rotating overhauser effect</i>
ROESY	<i>rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEN	<i>two center shared electron number</i>
Ser	Serin
SOD	Superoxiddismutase
SV(P)	<i>split valence basis</i>
tBut	tertiar-Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TMEDA	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
Trityl	Triphenylmethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
TZVP	<i>triple ζ split valence basis</i>
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i>
Val	Valin
XAS	<i>X-ray absorption spectroscopy</i>
XOD	Xanthinoxidase

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1:	Natürliche Schutzmechanismen zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	1
Abbildung 1.2:	Enzymstrukturen und Aktivzentren der unterschiedlichen SODs, SODs von oben nach unten: der binukleare Cu/Zn- ¹⁰ (<i>bos taurus erythrocyt</i> ; pdb 2sod), mononukleare Fe/Mn- ¹² (<i>e. coli</i> , pdb 1ISB) und die ebenfalls mononukleare Ni-SOD ¹⁵ (<i>S. seoulensis</i> ; pdb 1Q0M).	3
Abbildung 1.3:	Bisheriges Verständnis des “ <i>mode of action</i> ” der NiSOD basierend auf experimentellen Beweisen	5
Abbildung 1.4:	Struktur des Nickelhakens aus der Festkörperstruktur der NiSOD ¹⁵ (<i>S. seoulensis</i> ; pdb 1Q0M)	6
Abbildung 2.1:	Prinzip der Peptidsynthese nach Merrifield für Peptide	9
Abbildung 2.2:	Bildung des OBt-Aktivesters mit anschließender Peptidkopplung	10
Abbildung 2.3:	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin	11
Abbildung 2.4:	Sequenz des synthetisch hergestellten Nonapeptids	12
Abbildung 3.1:	ESI-MS des Nonapeptides 1027 Na ⁺ -Peak, 1048 K ⁺ -Peak	14
Abbildung 3.2:	¹ H-Spektrum des Nonapeptides in DMSO-d ₆	14
Abbildung 3.3:	¹³ C-Spektrum des Nonapeptides in DMSO-d ₆	15
Abbildung 3.4:	Temperaturabhängigkeit des ¹ H-NMR-Spektrums des Nonapeptides im Bereich von 6 - 9 ppm; ein ähnliches Verhalten wird im Bereich von 0 - 6 ppm ebenfalls beobachtet.	16
Abbildung 3.5:	Bezeichnung der C-Atome in den Aminosäuren für die Zuordnung der ¹ H-NMR und ¹³ C-NMR Signale	17
Abbildung 3.6:	[¹ H- ¹³ C]-HSQC-DEPT-Spektrum des Nonapeptids aufgenommen in DMSO-d ₆ bei Raumtemperatur (x-Achse ¹ H, y-Achse ¹³ C)	18
Abbildung 4.1:	ESI-Massenspektren einer Nonapeptidlösung mit zwei eq. Ni ^{II} , 1006 entspricht Nonapeptid, 1061 entspricht [1:1] Ni ^{II} -Peptidkomplex; (a) sofortige Messung, (b) nach einem Tag, (c) nach einer Woche (Lagerung bei 5°C)	20

- Abbildung 4.2:** Bild oben: experimentelles sowie theoretisches Isotopenmuster des Nickels im [1:1] Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes. Bild unten: ESI-Spektrum einer methanolischen Ni^{II}-Nonapeptidlösung mit einem Verhältnis von 1 eq. Ni^{II} zu 1 eq. Nonapeptid 21
- Abbildung 4.3:** Links: Wellenlängenscan des Ni^{II}-Komplexes zeigt eine Zunahme der Extinktion mit steigender Ni^{II}-Konzentration ; Rechts: Extinktionskoeffizient bei steigender Ni^{II}-Konzentration 23
- Abbildung 4.4:** ¹H-NMR-Spektren des Nonapeptid (unten) sowie des Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes (oben), aufgenommen in DMSO-d₆ bei 25°C 25
- Abbildung 4.5:** ¹³C-NMR-Spektren des Nonapeptides (unten) sowie des Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes (oben), aufgenommen in DMSO-d₆ bei 25°C 26
- Abbildung 4.6:** CD-Spektren (109 – 360 nm) des 0,2 mM Nonapeptides ohne Ni^{II}-Ionen (rot), mit 0,4 mM Ni^{II}-Ionen (schwarz); aufgenommen bei 25°C in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7); die Schichtdicke der Quarzküvette betrug 1 mm 27
- Abbildung 5.1:** Nachweis der SOD-Aktivität des Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes: 1 Kontrolle; 2 nur Nonapeptid; 3 nur NiCl₂; 4 Nonapeptid/NiCl₂-Gemisch [1:2] 29
- Abbildung 5.2:** Zeitliche Änderung im UV/Vis-Spektrum einer 1 mM [2:1]-Ni^{II}-Nonapeptidlösung nach Zugabe geringster Mengen KO₂ 31
- Abbildung 5.3:** Graph eines Aktivitätstests, mit der Kontrollgerade und der Gerade mit SOD-Aktivität (0,34 μM Nonapeptid und 0,68 μM Ni^{II}) (erkennbar durch flacheren Anstieg) in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) bei Raumtemperatur 32
- Abbildung 5.4:** Zunahme des Anstieges mit der Zeit bei Aktivitätsmessung einer Probe mit geringer Ni^{II}-Komplekonzentration in 50mM Phosphatpuffer (pH 7,8) bei Raumtemperatur 33
- Abbildung 5.5:** Einfluss der Ni^{II}-Konzentration auf die SOD-Aktivität des Biomimetikums (im substratlimitierten Bereich) 35
- Abbildung 5.6:** Extrapolierung der molaren SOD-Aktivität einer [2:1] Ni^{II}-Nonapeptidkomplexes gegen Null (maximale Aktivität) 36
- Abbildung 6.1:** Ausschnitt des [¹H,¹H]-ROESY-Spektrums mit den korrespondierender H^NH^α-Kreuzsignalen der Rückgratsequenz des Nonapeptids; Pro5 fehlt, da es kein H^α besitzt 41

Abbildung 6.2:	Konformation des <i>cis</i> - bzw. <i>trans</i> -Prolins	42
Abbildung 6.3:	Ausschnitt des [¹ H, ¹ H]-ROESY-Spektrum des Nonapeptids mit typischen H ^{αi-1} zu H ^δ -Kreuzsignalen einer <i>trans</i> -Verknüpfung des Pro5 im Nonapeptid	42
Abbildung 6.4:	Die für die Zuordnung der Kreuzsignale in [¹ H, ¹ H]-ROESY-Spektrum verwendeten Bezeichnungen der Atome in den einzelnen Aminosäuren des Nonapeptids	43
Abbildung 6.5:	Konformationen von zehn 3D-Lösungsstrukturen resultieren aus NOE-Einschränkungen des Nonapeptids mit den niedrigsten Zielfunktionen aus CYANA	47
Abbildung 6.6:	Die Konformationsvielfalt (zehn) des Nonapeptids sowie die relative Häufigkeit (Boltzmann-Verteilung) der einzelnen Konformere; berechnet auf dem BP86(MARI-J)/SV(P)/COSMO-Niveau	49
Abbildung 6.7:	Die zwei auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau berechneten energetisch günstigsten Konformere des Nonapeptids	50
Abbildung 6.8:	Vergleich der 3D-Vorzugskonformation in Lösung der ersten sechs Aminosäurereste des Nonapeptides (blau) mit der nachoptimierten Festkörperstruktur des Nickelhakens (rot) Die vier Liganden für die Ni ^{II} -Komplexierung sind eingekreist, berechnet auf dem BP86(MARI-J)/SV(P)/COSMO-Niveau	51
Abbildung 6.9:	Externe Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung der <i>cis</i> -Prolin-Konformation in der Festkörperstruktur der NiSOD (<i>S. seoulensis</i> ; pdb 1Q0M), Bindungslängen berechnet auf BP86(MARI-J)/TZVP-Niveau	52
Abbildung 6.10:	Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen in der <i>trans</i> -Prolin-Vorzugskonformation des Hexapeptidmodells, berechnet auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau	53
Abbildung 6.11:	Die auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau berechnete energetisch günstigste Form des Hexapeptidmodells mit intramolekularen Wasserstoffbrücken für die <i>cis</i> -Konformation der NiSOD	54
Abbildung 6.12:	Auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau optimierter Lowspin-Nickelkomplex des Nonapeptides	57
Abbildung 6.13:	Auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau optimierter Highspin-Nickelkomplex des Nonapeptides	58
Abbildung 7.1:	Aktivzentrum der NiSOD mit Ni ^{II} im Zentrum (links), Ni ^{III} und der Imidazolring von His1 als fünften Liganden (rechts)	62

Abbildung 7.2:	Vergleich der molaren Aktivitäten der modifizierten Peptide (Fehlerbalken 10%): Nonapeptid= unmodifiziertes Nonapeptid; His1Ala = His1Ala-Mutante; Tyr9Ala = Tyr9Ala-Mutante; HP Asp = Ala1-Cys2-Asp3-Ala4-Pro5-Cys6; HP Asp3Ala = Ala1-Cys2-Ala3-Ala4-Pro5-Cys6.	63
Abbildung 7.3:	Modellsystem für das Nickelzentrum von Shearer <i>et al.</i> ⁹²	66
Abbildung 7.4:	Benzoylierung von His1	67
Abbildung 9.1:	Bezeichnung der C-Atome in den Aminosäuren für die Zuordnung der ¹ H- und ¹³ C-Signale	80
Abbildung 9.2:	„two center shared electron numbers“ (σ_{SEN}) verschiedener Wasserstoffbrücken mit jeweils berechneten Energien (E_{HB}). Der Anstieg m ist gleich der Faktor $\lambda = 345$ kJ/mol	86
Abbildung A.1:	[¹ H- ¹³ C]-HMBC-Spektrum des Nickel-Nonapeptidkomplexes in DMSO-d ₆ bei Raumtemperatur (x-Achse ¹ H, y Achse ¹³ C)	98
Abbildung A.2:	[¹ H- ¹ H]-COSY-Spektrum des Nonapeptids in D ₂ O bei Raumtemperatur	90
Abbildung A.3:	[¹ H- ¹ H]-COSY-Spektrum des Nickel-Nonapeptidkomplexes in D ₂ O bei Raumtemperatur	91
Abbildung A.4:	Ausschnitt aus dem [¹ H- ¹³ C]-HSQC-TOCSY-Spektrum des Nickel-Nonapeptidkomplexes in D ₂ O bei Raumtemperatur (x-Achse ¹ H, y Achse ¹³ C)	92
Abbildung A.5:	gesamtes [¹ H- ¹³ C]-HSQC-TOCSY-Spektrum des Nickel-Nonapeptidkomplexes in D ₂ O bei Raumtemperatur (x-Achse ¹ H, y Achse ¹³ C)	93
Abbildung A.6:	¹ H-Spektrum des Hexapptids in DMSO bei Raumtemperatur; unteres Spektrum ohne Nickelperchlorat [Ni(ClO ₄) ₂] Hexaaqua, oberes Spektrum mit Überschuss an Ni(ClO ₄) ₂ ; die Verbreiterung des Signals im oberen Spektrum bei 3,5 ppm ist durch das in Ni(ClO ₄) ₂ enthaltene Wasser erklärbar	94
Abbildung A.7:	komplettes [¹ H, ¹ H]-ROESY-Spektrum des Nonapeptids (Einheit ppm), in 90% H ₂ O/D ₂ O bei Raumtemperatur aufgenommen	95

Tabelle 6.1:	Kreuzsignale im [¹ H, ¹ H]-ROESY-Spektrum des Nonapeptids mit den zugehörigen oberen Abstandsbeschränkungen	44
Tabelle 6.2:	NMR- und Verfeinerungsstatistik für die Nonapeptidstruktur und seines Nickelkomplexes	46
Tabelle 6.3:	Bindungsabstände (in Å) des Low- und Highspin-komplexes; berechnet auf dem BP86(MARI-J)/TZVP/COSMO-Niveau	58
Tabelle 9.1:	Aus der Konformationsanalyse berechnete Diederwinkelschränkungen und zusätzliche Diederwinkelbeschränkungen für das Metallzentrum	76
Tabelle 9.2:	Distanzeinschränkungen für die Nickelbindstelle	76
Tabelle 9.3:	Verwendete Substanzen für die Peptidsynthese bezogen auf ein Rink-Amid-MBHA-Harz mit einer Beladung von 0,73 mmol/g und einer eingesetzten Menge von 300 mg	79
Tabelle 9.4:	Berechnete Bindungsenergien der Wasserstoffbrücken E_{HB} in kJ/mol und „two center shared electron numbers“ σ_{HB} , rechts: Protonendonator, links: Protonenakzeptor	87

Literaturverzeichnis

- 1 Stryer, L. *Biochemie*; 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin **1999**.
- 2 Muller, F. *J. Am. Aging Assoc.* **2000**, 23, 227.
- 3 Andreyev, A. Y.; Kushnareva, Y. E.; Starkov, A. A. *Biochemistry (Mosc)* **2005**, 70, 200.
- 4 Rattan, S. *Free Radic Res* **2006**, 40 (12): 1230.
- 5 Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. *Biochem J.* **1984**, 219(1),1.
- 6 Fridovich, I *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, 247, 1.
- 7 Storz, G.; Tartaglia, L. A.; Farr, S. B.; Ames, B. N. *Trends Genet.* **1990**, 6, 368
- 8 Cass, A. E. G. *Metalloproteins*, Verlag Chemie, Vol. 1, **1985**.
- 9 Riley D. R. *Chem Rev.* **1999**, 99, 2573.
- 10 Tainer, J. A. ;Getzoff, E. D.; Beem, K. M.; Richardson, J. S. ; Richardson, D. C. *J. Mol. Biol.* **1982**, 160, 181.
- 11 Parge, H. E.; Getzoff, E. D.; Scandella C. S.; Hallewell, R. A.; Tainer, J. A. *J Biol Chem.* **1986**; 261(34), 16215.
- 12 Lah, M.S.; Dixon, M.M.; Patridge, K.A.; Stallings, W.C.; Fee, J.A.; Ludwig, M.L. *Biochemistry*, **1995**, 34, 1646.
- 13 Barra, D; Schinia, M. E.; Simmaco, M.; Bannister, J. V.; Bannister, W. H.; Rotilio, G.; Bossa, F.; *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 12595.
- 14 Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D *Biochemistry* **2004**, 43, 8038.
- 15 Wuerges, J.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Yim, H. S.; Kang, S. O.; Carugo, K. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 8569.
- 16 Chodhury, S. B.; Lee, J. W.; Davidson, G.; Yim, Y. I.; Bose, K. ; Sharma, M. L. ; Kang, S. O.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J. *Biochemistry* **1999**, 38, 3744.
- 17 Youn, H. D.; Youn, H.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Lee, J. K.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 334, 341.
- 18 Kim, E. J.; Kim, H. P.; Hah, Y. C.; Roe, J. H. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 241, 178.
- 19 Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *Biochem. J.* **1996**, 318, 889.

-
- 20 Wolfe-Simon, F.; Grzebyk, D.; Schofield, O.; Falkowski, P. G. *J. Phycol.* **2005**, *41*, 453.
- 21 Amoroso, M. J.; Schubert, D.; Mitscherlich, P.; Schumann, P.; Kothe, E. *J. Basic Microbiol.* **2000**, *40*, 295.
- 22 Eitinger, T. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 7821.
- 23 Palenik, B.; Brahamsha, B.; Larimer, F. W.; Land, M.; Hauser, L.; Chain, P.; Lamerdin, J.; Regala, W.; Allen, E. E.; McCarren, J.; Paulsen, I.; Dufresne, A.; Partensky, F.; Webb, E. A.; Waterbury, J. *Nature* **2003**, *424*, 1037.
- 24 Rocap, G.; Larimer, F. W.; Lamerdin, J.; Malfatti, S.; Chain, P.; Ahlgren, N. A.; Arellano, A.; Coleman, M.; Hauser, L.; Hess, W. R.; Johnson, Z. I.; Land, M.; Lindell, D.; Post, A. F.; Regala, W.; Shah, M.; Shaw, S. L.; Steglich, C.; Sullivan, M. B.; Ting, C. S.; Tolonen, A.; Webb, E. A.; Zinser, E. R.; Chisholm, S. W. *Nature* **2003**, *424*, 1042.
- 25 Kim, E.-J.; Chung, H.-J.; Suh, B.; Hah, Y. C.; Roe, J.-H. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*(8), 2014.
- 26 Kim, J.-S.; Kang, S.-O.; Lee, J. K. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*(20), 18455.
- 27 Culotta, V. C.; Yang, M.; O'Halloran, T. V. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1763*, 747.
- 28 Amoroso, M. J.; Schubert, D.; Mitscherlich, P.; Schumann, P.; Kothe, E. *J. Basic Microbiol.* **2000**, *40*, 295.
- 29 Bryngelson, P. A.; Arobo, S. E.; Pinkham, J. L.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 460.
- 30 Kim, E. J.; Chung, H. J.; Suh, B.; Hah, Y. C.; Roe, J. H. *Mol. Microbiol.* **1998**, *27*, 187.
- 31 Ringe, D.; Petsko, G. A.; Yamakura, F.; Suzuki, K.; Ohmori, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 3879.
- 32 Stallings, W. C.; Pattridge, K. A.; Strong, R. K.; Ludwig, M. L. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 16424.
- 33 Sines, J.; Allison, S.; Wierzbicki, A.; McCammon, J. A. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 959.
- 34 Fiedler, A. T.; Bryngelson, P. A.; Maroney, M. J.; Brunold, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5449.
- 35 Szilagyi, R. K.; Bryngelson, P. A.; Maroney, M. J.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3018.
- 36 Pelmeshnikov, V.; Siegbahn, P. E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7466.
- 37 Prabhakar, R.; Morokuma, K.; Musaev, D. G. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1438.

- 38 Mullins, C. S.; Grapperhaus, C. A.; Kozolowski, P. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 617.
- 39 Barondeau, D. P.; Getzoff, E. D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 765.
- 40 unveröffentlichte Forschungsergebnisse AG Weston.
- 41 Merrifield, R. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- 42 Carpino L.A.; Han G.Y.; *J. Org. Chem.* **1972**, 37: 3404-3409.
- 43 Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*, Volume E 22a, Thieme Verlag Stuttgart-New York **2002**.
- 44 Knorr, R. et al. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927.
- 45 Bernatowicz, M. S. et al. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4645.
- 46 Kaiser, T. et al. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1187.;
- 47 Han, Y. X. et al. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4307.
- 48 Stewart, J. D.; Young, J. D.; *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company **1984**.
- 49 Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Aufl, Springer, Berlin, **2001**
- 50 CD Römpp Chemie Lexikon, Version 1.0, Thieme, Stuttgart, **1995**
- 51 Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2005**.
- 52 DeHoffmann, E.; Stroobant, V *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester **2002**.
- 53 Friebolin, H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 3.Edition, VCH, Weinheim, **2006**.
- 54 Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids* Wiley, New York **1986**.
- 55 Hillenkamp, F; Peter-Katalinic, J. *A Practical Guide to MALDI-MS. Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley-VCH **2007**.
- 56 Beyer, H; Walter, W *Lehrbuch der Organischen Chemie* , S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig, (23 Auflage) **1998**.
- 57 Ellman, G. L., *Arch. of Biochem. and Biophys.* **1959**, 82, 70.
- 58 Shearer, J.; Long, L. M. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 2358.
- 59 Bertini, I.; Luchinat, C.; Giacomo Parigi, G.; Pierattelli, R. *ChemBioChem* **2005**, 6, 1536.
- 60 Weil, J. ;Bolton, J.; Wertz, J. *Electron Paramagnetic Resonance*, John Wiley & Sons, Inc., **1994**.
- 61 Nakanshi, K.; Berova, N.; Woody, R. W. *Circular Dichroismus: Principles and Applications* **1994**, VCH Publisher, Inc
- 62 Beauchamp, C.; Fridovich. I. *Anal. Biochem.* **1971**, 44, 276.

- 63 Lokesh, B. R.; Cunningham, M. L. *Toxicol. Lett.* **1986**, 34(1), 75
- 64 McCord, J. M.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6049.
- 65 Bielski, H. J.; Shiue, G. G.; Bajuk, S. *J. Phys. Chem.* **1980**, 84, 830.
- 66 Tabbi, G.; Driessen, W. L.; Reedijk, J.; Bonomo, R. P.; Veldman, N.; Spek, A. L. *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 1168.
- 67 Weiss, R. H.; Flickinger, A. G.; Rivers, W. J.; Hardy, M. M.; Aston, K. W.; Ryan, U. S.; Riley, D. P. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 23049.
- 68 Michaels, H. B.; Hunt, J. W. *Ana. Biochem.* **1978**, 135
- 69 Fielden, E. M.; Roberts, P. B.; Bray, R. C.; Lowe, D. J.; Mautner, G. N.; Rotilio, G.; Calabrese, L. *Biochem. J.* **1974**, 139, 49.
- 70 Riley, D. P.; Rivers, W. J.; Weiss, R. H. *Anal. Biochem.* **1991**, 196.
- 71 unveröffentlichte Forschungsergebnisse AG Kothe.
- 72 Neupane, K. P.; Shearer, J. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 10552.
- 73 Levitt, M. *Spin Dynamics*, John Wiley & Sons **2001**
- 74 Wedemeyer W. J., Welker E., Scheraga H. A., *Biochemistry* **2002**, 41, 14637.
- 75 D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Biochemistry* (**2004**), 43, 8038 Röntgenstruktur niSOD Querverweis
- 76 Guntert, P. Billeter, M. Ohlenschlager, O.; Braun L. R.; Wuthrich, K. *J. Biomol. NMR* **1998**, 12, 543.
- 77 Herrmann, T.; Guntert, P.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 09
- 78 Abe, H.; Braun, W.; Noguti, T.; Gö, N. *Comput. Chem.* **1984**, 8, 239.
- 79 Becke, A. D. *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys.* **1988**, 38, 3098,
- 80 Perdew, J. P. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1986**, 33, 8822.
- 81 Schäfer, A.; Horn, H.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1992**, 97, 2571-2577
- 82 Sierka, M.; Hogeckamp, A.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **2003**, 118, 9136-9148;
- 83 Eichkorn, K.; Treutler, O.; Öhm, H.; Häser, M.; Ahlrichs, R. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 240, 283.
- 84 Eichkorn, K.; Weigend, F.; Treutler, O.; Ahlrichs, R. *Theor. Chem. Acc.* **1997**, 97, 119; d) Weigend, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 1057.
- 85 Ahlrichs, R.; Bär, M.; Häser, M.; Horn, H.; Kölmel, C. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 162, 165.
- 86 Schäfer, A.; Klamt, A.; Sattel, D.; Lohrenz, J. C. W.; Eckert, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 2187.
- 87 Weigend, F.; Ahlrichs, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7, 3297.

-
- 88 Wedemeyer W. J.; Welker E.; Scheraga H. A., *Biochemistry* **2002**, 41, 14637.
- 89 Weinhold, F., *THEOCHEM* **1997**, 398-399, 181.
- 90 Reiher, M.; Sellmann, D.; Hess, B. A.; *Theor. Chem. Acc.* **2001**, 106, 379.
- 91 Reiher, M.; Salomon, S.; Hess, B. A.; *Theor. Chem. Acc.* **2001**, 107, 48.
- 92 Chou, P.Y.; Fasman, G.D. *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 251.
- 93 Ekberg, M.; Sahlin, M.; Eriksson, M.; Sjöberg, B.-M. *J. Bio. Chem.* **1996**, 271, 20655.
- 94 Shearer, J.; Zhao, N. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 9637
- 95 Varian Inc., Palo Alto, USA
- 96 Bartels, C.; Xia, T.; Billeter, M.; Guntert, P.; Wuthrich K, *J Biomol NMR*, **1995**, 6, 1
- 97 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.