

## Synthese eines bifunktionellen Spin-Labels zur Quervernetzung von Proteinen

Herbert R. Wenzel<sup>1)</sup>\*, Gabriele Becker und Eberhard von Goldammer

Ruhr-Universität Bochum, Institut für Biophysik,  
Postfach 102148, D-4630 Bochum 1

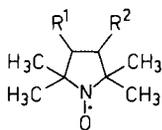
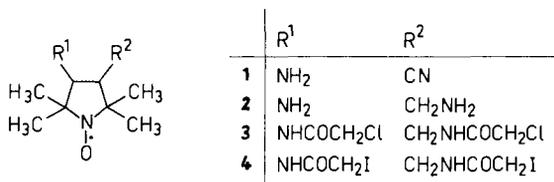
Eingegangen am 16. Dezember 1977

### Synthesis of a Bifunctional Spin-label for Cross-linking of Proteins

The nitroxyl radical **4** of the pyrrolidine series with two functional iodoacetamido groups was synthesized. It appears to be useful for cross-linking of proteins and subsequent conformational studies by the ESR method.

Zwei Methoden, die sich bei Konformationsuntersuchungen an Proteinen besonders bewährt haben, sind die kovalente Quervernetzung mit bifunktionellen Reagenzien<sup>2)</sup> und die Spinmarkierung einzelner Aminosäurereste<sup>3)</sup>. Eine Kombination beider Techniken, das heißt die Verwendung bifunktioneller Spin-Label, wurde von Morrisett vorgeschlagen<sup>4)</sup>, ähnliche Überlegungen stammen von Calvin und Mitarbeitern<sup>5)</sup>.

Ein solcher Spin-Label könnte, an zwei Punkten von Proteinketten verankert, als eine Art „molekularer Spannungsmesser“ fungieren, in dessen ESR-Spektrum sich Protein-Konformationsänderungen manifestieren. Denkbar ist sowohl eine intramolekulare Quervernetzung als auch eine intermolekulare, etwa in einem Multienzymkomplex. Darüber hinaus ist bei einer doppelten Verankerung im allgemeinen eine starke Immobilisierung des Spin-Labels zu erwarten, was für eine brauchbare Abschätzung der Rotationskorrelationszeit des gesamten Proteinmoleküls wichtig ist<sup>6)</sup>.



Als einen ersten Schritt auf dem Wege zu derartigen Experimenten beschreiben wir hier die Synthese eines bifunktionellen Spin-Labels aus der Pyrrolidin-Reihe mit zwei funktionellen Iodoacetamidgruppen. Ausgangsverbindung ist das Aminonitril **1**<sup>7)</sup>, das mit Lithiumaluminium-

<sup>1)</sup> Neue Adresse: Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, Lehrstuhl Biochemie, Postfach 8640, D-4800 Bielefeld 1.

<sup>2)</sup> F. Wold, *Methods Enzymol.* **25**, 623 (1972).

<sup>3)</sup> L. J. Berliner, *Spin Labeling, Theory and Applications*, Academic Press, New York 1976.

<sup>4)</sup> J. D. Morrisett in Lit.<sup>2)</sup>, S. 273.

<sup>5)</sup> P. Ferruti, D. Gill, M. P. Klein, H. H. Wang, G. Entine und M. Calvin, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3704 (1970).

<sup>6)</sup> R. C. McCalley, E. J. Shimshick und H. M. McConnell, *Chem. Phys. Lett.* **13**, 115 (1972).

<sup>7)</sup> A. Rassat und P. Rey, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 815.

hydrid – weitgehend ohne Reaktion der Nitroxylfunktion – zum Diamin **2** reduziert wird. Acylierung mit Chloracetylchlorid liefert das Bis-Chloracetamid **3**, Halogenaustausch mit Natriumiodid in Aceton führt zum Bis-Iodacetamid **4**, das in guter Ausbeute als gelber Feststoff anfällt.

Der bifunktionelle Spin-Label sollte sich hauptsächlich zur Verknüpfung von Cysteinresten eignen, als weitere Reaktionspartner kommen die Seitenketten von Histidin und Lysin in Frage. Der maximal überbrückbare Abstand beträgt etwa 13 Å.

Erste Modifizierungsversuche wurden an Human-Hämoglobin mit Erfolg durchgeführt.

## Experimenteller Teil

*3-(2-Iodacetamido)-4-[(2-iodacetamido)methyl]-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl (4)*: Zu 100 mg (2.6 mmol)  $\text{LiAlH}_4$  in 30 ml wasserfreiem Ether tropft man unter Rühren eine Lösung von 180 mg (1.0 mmol) 3-Amino-4-cyan-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl (**1**)<sup>7)</sup> in 20 ml wasserfreiem Ether und kocht dann 2 h unter Rückfluß. Nach dem Abkühlen pipettiert man nacheinander 0.1 ml Wasser, 0.1 ml 15proz. Natronlauge und 0.3 ml Wasser hinzu, rührt 15 min bei Raumtemp. und filtriert. Das gelbe Filtrat wird im Rotationsverdampfer eingengt und der verbleibende Rückstand in 30 ml Methylenchlorid gelöst.

Man gibt 10 ml 0.2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  und dann unter starkem Rühren 190 µl (2.5 mmol) Chloracetylchlorid zu. Nach 10 min wird die organische Phase abgetrennt, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Rotationsverdampfer eingedampft. Den gelben Rückstand löst man in 30 ml trockenem Aceton und fügt 500 mg (3.3 mmol) Natriumiodid in 10 ml trockenem Aceton hinzu. Nach 20stdg. Rühren bei Raumtemp. unter Lichtausschluß wird das ausgefallene Natriumchlorid abfiltriert und die Lösung im Rotationsverdampfer eingedampft. Man schüttelt den braunen Rückstand mit einer Mischung aus 300 ml Methylenchlorid und 20 ml Wasser durch, trennt die organische Phase ab, trocknet sie mit  $\text{MgSO}_4$  und engt sie i. Vak. auf etwa 10 ml ein, wobei das Bis-Iodacetamid **4** auszufallen beginnt. Nach einem Tag im Kühlschrank werden 240 mg (46%) des hellgelben Feststoffes abzentrifugiert.

Eine abschließende Reinigung erfolgt durch zweimaliges Umkristallisieren aus Essigester. Schmp. > 200°C (Zers.).

IR (KBr): 3310, 3280, 3100 (NH); 1655 (Amid I); 1580 (Amid II). – ESR (X-Band): Triplett,  $a_N(\text{H}_2\text{O}) = 16.0 \text{ G}$ . – MS (70 eV):  $m/e = 522 (\text{M}^+)$ .

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{I}_2\text{N}_3\text{O}_3$  (522.2) Ber. C 29.90 H 4.25 I 48.61 N 8.05

Gef. C 29.93 H 4.05 I 48.59 N 8.03

[437/77]