

Kombination chemischer und enzymatischer Methoden zur regiospezifischen Modifizierung von Proteinen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Christoph Meyer

geb. am 06.10.1979 in Trier

Gutachter:

1. Prof. Dr. Frank Bordusa
2. Prof. Dr. Mike Schutkowski
3. Prof. Dr. Christian Becker

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16. Mai 2019

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Anwendung modifizierter Proteine	1
1.2. Methoden zur Modifizierung von Proteinen	2
1.2.1. Chemische Verfahren zur nicht-orthogonalen Derivatisierung von Proteinen	3
1.2.2. Molekularbiologische Verfahren zur nicht-orthogonalen Derivatisierung von Proteinen	4
1.2.3. Regiospezifische Verfahren zur Modifizierung von Proteinen	4
1.2.3.1. Molekularbiologische Verfahren	5
1.2.3.2. Enzymatische Verfahren	6
1.2.4. Chemoselektive Verfahren zur Modifizierung von Proteinen	11
1.2.4.1. Diels-Alder Reaktionen	13
1.2.4.2. 1,3-dipolare Cycloadditionen	13
1.2.4.3. Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition an Alkine (Klick-Reaktion)	13
2. Zielstellung	15
3. Materialien	17
3.1. Chemikalien und Harze	17
3.2. Oligodesoxyribonukleotide	17
3.3. Vektoren/Plasmide	17
3.4. Bakterien- und Hefestämme	18
3.5. Nährmedien	18
3.6. Geräte	19
3.6.1. Chromatographie	19
3.6.2. Massenspektrometrie	19
3.6.3. NMR-Spektroskopie	19
3.6.4. UV-Spektroskopie	19
4. Methoden	20
4.1. Analytische Methoden	20
4.1.1. Chromatographie	20
4.1.1.1. Hydrophobe Interaktions Chromatographie (HIC)	20
4.1.2. Proteinanalytik	20
4.1.3. Massenspektrometrie	20
4.2. Molekularbiologische Arbeiten	21
4.3. Proteinbiochemische Arbeiten	21
4.3.1. Expression und Reinigung der Trypsinvarianten	21
4.3.2. Charakterisierung der Trypsinvarianten	22
4.3.2.1. Hydrolysestudien	22
4.3.2.2. Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und k_{cat}	22
4.3.2.3. Acyltransfer- und Transamidierungsreaktionen	22
4.3.2.4. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von hCyp18	23
4.3.3. ELISA	23
4.3.3.1. F _{ab} -Anti-TNF α	23

4.3.3.2. F _{ab} -Anti-Her2	24
4.3.4. Enzymatische Derivatisierungen von Proteinen.....	24
4.3.4.1. Acyltransfer- und Transamidierungsreaktionen.....	24
4.3.5. Expression der zu modifizierenden Proteine	24
4.4. Chemische Arbeiten	24
4.4.1. Peptidsynthese	24
4.4.1.1. Verwendete Peptide.....	25
4.4.2. Klick-Reaktion.....	25
4.4.2.1. Klick-Reaktion in Lösung.....	25
4.4.2.2. Klick-Reaktion mit Cu(I)-NTA am polymeren Träger.....	26
4.4.3. Diels-Alder Cycloaddition: normal/invers.....	26
4.4.4. Synthesen.....	26
5. Ergebnisse	33
5.1. Chemische Synthesen	33
5.1.1. Substratsynthese	33
5.1.2. Reaktandsynthese.....	33
5.1.2.1. Tetrazinsynthesen.....	34
5.1.2.2. Alken-Synthesen.....	35
5.1.2.3. Curtius-Reaktion.....	36
5.2. Auswahl der zu exprimierenden Trypsinvarianten.....	38
5.3. Expression und Reinigung der Trypsinvarianten.....	39
5.4. Charakterisierung der Trypsinvarianten.....	40
5.4.1. Initiale Hydrolysestudien.....	40
5.4.2. Initiale Acyltransferreaktionen.....	43
5.5. Studien zur N-terminalen Derivatisierung von Proteinen.....	45
5.5.1. N-terminale Modifizierung von Pin1	46
5.5.2. N-terminale Modifizierung von <i>E. coli</i> Parvulin10.....	47
5.5.3. N-terminale Modifizierung von Strep-YRH-CyP18-OH.....	48
5.5.4. N-terminale Modifizierung von YRAH-CyP18-YRHAAG-OH.....	49
5.6. Studien zur C-terminalen Modifizierung von Proteinen	50
5.6.1. C-terminale Modifizierung von Modellpeptiden.....	51
5.6.2. C-terminale Modifizierung des F _{ab} -Anti-Her2-Fragments mit Tetrazin	53
5.6.3. C-terminale Modifizierung des F _{ab} -Anti-TNF α -Fragments	54
5.7. Chemische Modifikation enzymatisch eingeführter Anker.....	55
5.7.1. Modellreaktionen für die inverse Diels-Alder Reaktion	55
5.7.2. Modellreaktionen für die kupferkatalysierte Klick Reaktion.....	56
5.8. Chemische Modifizierungen	57
5.8.1. Klick-Reaktion an enzymatisch modifizierten Modellpeptiden.....	57
5.8.2. Chemische Modifizierung des N-terminal eingeführten Ankers	59
5.8.2.1. Modifizierung von <i>h</i> Pin1, <i>h</i> Cyclophilin18 und <i>E. coli</i> Parvulin10.....	59
5.8.2.2. Klick-Reaktion am Protein in Lösung.....	60
5.8.2.3. Chemische Modifizierung des N-terminal eingeführten Norbornen-Ankers.....	61
5.8.3. Chemische Modifizierung des C-terminal eingeführten Tetrazinankers	62
5.8.3.1. Modifizierung von F _{ab} -Anti Her 2-YRHAAC(Tetrazin)-OH mit Norb-NBD	63
5.8.3.2. Modifizierung von F _{ab} -Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH mit Norb-DM1.....	64
5.8.3.3. Modifizierung von F _{ab} -Anti TNF α -YRHAAC(Tetrazin)-OH mit CF und PEG.....	65

5.9. Überprüfung der Funktionalität der modifizierten Proteine.....	66
5.9.1. Dansyl-PS-RH-CyP18-OH.....	67
5.9.2. F _{ab} -Anti-TNF α -YRHAAC(CF)-OH und Fab-Anti-Her2-YRHAC(DM1)-OH	68
6. Diskussion.....	70
6.1. Enzymatische Modifizierung von Proteinen	70
6.1.1. Initiale Hydrolysestudien.....	70
6.1.2. Initiale Acyltransferreaktionen	74
6.1.3. N-terminale Modifizierung von Peptiden und Proteinen	74
6.1.4. C-terminale Modifizierung von Peptiden und Proteinen	75
6.1.4.1. Optimierungsoptionen der Transamidierungsreaktion.....	77
6.1.5. Modifizierung von Antikörpern.....	78
6.2. Chemische Synthese der Edukte	79
6.2.1. Chemische Synthese der Tetrazine und deren Reaktivität.....	80
6.2.2. Diels-Alder Reaktionen der Tetrazine.....	82
6.2.3. Kupferkatalysierte Klick-Reaktion	85
6.3. Chemische Modellreaktionen am Protein	86
6.3.1. Inverse Diels-Alder Reaktion	86
6.3.2. 1,3-dipolare Cycloaddition: „Klick-Reaktion“.....	87
6.3.3. Überprüfung der Funktionalität der N- und C-terminal modifizierten Proteine.....	88
6.5. Methoden der Proteinmodifikation im Vergleich	89
6.5.1. Biotin-Ligase, Sortase, Transglutaminase und Formylglycin-generierendes Enzym im Vergleich mit Trypsinligase	90
7. Zusammenfassung.....	94
8. Abkürzungsverzeichnis	96
9. Literatur	98
10. Anhang.....	104
10.1. Analytik.....	104
10.2. Proteinsequenzen.....	108

1. EINLEITUNG

1.1. ANWENDUNG MODIFIZIERTER PROTEINE

Kovalente Modifizierungen von Proteinen nahmen ihren Anfang mit der Bestimmung der Aminosäurekonstitution durch deren Derivatisierung mit Hilfe chemischer Methoden. Vom Edman-Abbau von Peptiden 1950^[1, 2] bis hin zur routinemäßigen Analyse ganzer Proteine 1967^[3] war die Modifizierung ausgewählter Aminosäuren in Proteinen die einzige Möglichkeit, Aussagen über die Aminosäurezusammensetzung bzw. Sequenz des jeweiligen Proteins zu erhalten. Als Beispiel ist hier die auch heute noch gebräuchliche Derivatisierung mittels 5,5-Dithiobis(2-nitro)benzoesäure (DTNB) zu nennen^[4], die eine quantitative Bestimmung frei zugänglicher Sulfhydrylgruppen in Proteinen ermöglicht.

Eine weitere Anwendung der Derivatisierung von Proteinen ist die Identifizierung katalytisch aktiver Aminosäureseitenketten in Proteinen. So führt die Zugabe von Tosyl-L-phenylalanin-chlormethylketon zu der Serinprotease Chymotrypsin zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms, was auf eine selektive Modifizierung der Histidinseitenkette im aktiven Zentrum des Enzyms zurückgeführt werden konnte^[5]. Eine weitere Methode, Aminosäuren eines Enzyms zu identifizieren, ist durch die chemische Modifizierung von Seitenketten möglich. So lassen sich u. a. die Carboxylgruppen von Glutamin- bzw. Asparaginsäure mit Carbodiimiden aktivieren und mit einem Nukleophil wie beispielsweise einer Aminosäure umzusetzen. Dabei kann man nach erfolgter Hydrolyse des modifizierten Proteins von der Anzahl der im Vergleich zum nicht modifizierten Protein zusätzlich vorhandenen, modifizierten Aminosäuren Rückschlüsse auf die Anzahl der modifizierten Aminosäureseitenketten ziehen. Bei dieser Verfahrensweise müssen auch mögliche Nebenreaktion beachtet werden: Bei der Aktivierung von Proteinen mit Carbodiimiden kommt es beispielsweise ebenfalls zur Modifikation von Tyrosin und Cystein^[6]. Die Identifizierung katalytisch aktiver Aminosäureseitenketten mittels chemischer Verfahren wurde mittlerweile jedoch weitestgehend durch strukturanalytische Verfahren wie die Röntgenkristallstrukturanalyse ersetzt.

Somit dienen neuere Verfahren zur artifiziellen Modifizierung von Proteinen hauptsächlich der Einführung von Wirkstoffen^[7] (wie z.B. Toxinen) oder Diagnostika^[8, 9] (wie z.B. Farbstoffen oder Radionukliden) und weisen somit sowohl akademische und therapeutische aber auch biotechnologische Relevanz auf.

Therapeutisch relevante Proteine kommen auf zwei verschiedene Arten zum Einsatz. Zum einen werden sie dazu verwendet, um nicht vorhandene, essentielle Proteine im Körper zu ersetzen oder sich gegen vorhandene maligne Strukturen zu richten. Zum anderen können sie zum Transport von Medikamenten im Organismus als eine Art Transportvehikel genutzt werden oder diagnostischen Zwecken dienen. Bei der Verwendung von Proteinen für therapeutische Zwecke ist entscheidend, dass deren physikochemischen¹ und pharmakokinetischen² Eigenschaften eine Anwendung im Organismus ermöglichen. Hierbei dient die Proteinmodifizierung der Erhöhung der Halbwertszeit, der Löslichkeit

¹ Intrinsische Eigenschaften des Moleküls wie Löslichkeit, Basizität, Azidität usw.

² Beschreibt alle Prozesse, die ein Molekül im Organismus beeinflussen wie Metabolisierung, Ausscheidung usw.

sowie der Verringerung der Immunogenität. Zur Verbesserung vor allem der Halbwertszeit im Organismus führt hierbei die Konjugation der entsprechenden Proteine mit natürlichen und synthetischen Polymeren, wie Polyethylenglycol (PEG) ^[10] oder Polysialylresten ^[11]. Pegyliertes Interferon alpha etwa wird bereits zur Behandlung von Hepatitis-Erkrankungen verwendet. Auch der Einsatz isosterer Aminosäuren in Proteinen führt zu einer veränderten Pharmakokinetik therapeutischer Proteine ^[12].

Ein „reverser“ Ansatz wird bei der Verwendung modifizierter Proteine zum Transport von Medikamenten im Organismus verfolgt; hier dient die Modifizierung als Therapeutikum und soll mit Hilfe des Proteins als Transportvehikel zum Zielorgan transportiert werden (z.B. als Antikörper-Wirkstoff-Konjugate ^[7]). Dabei sind die Wirkstoffe z.T. über hydrolyseempfindliche Bindungen an ein Protein geknüpft, welches sie zum Zielorgan bzw. -gewebe transportiert und dann freisetzt ^[13]. Auch hier können Proteine mit therapeutisch wirksamen Aminosäureisosteren (wie Thiaprolin oder Chlorotyrosin) als Vehikel zum Wirkstofftransport dienen ^[14, 15].

Von besonderem akademischem Interesse ist die Modifizierung von Proteinen mit Chromogenen. Zur Anwendung kommen derartige Substanzen bei der Untersuchung von Katalysemechanismen, Substratbindungsereignissen und Faltungsprozessen ^[16]. Hierbei spielt die Einzelmolekülspektroskopie eine entscheidende Rolle, welche die Echtzeitbeobachtung struktureller Veränderungen in Proteinen ermöglicht ^[17].

Des Weiteren werden mit Farbstoffen modifizierte Proteine zur Beobachtung biologischer Prozesse innerhalb der Zelle verwendet. Hierbei ist es sowohl möglich, ein bereits mit einem Farbstoff modifiziertes Protein in eine lebende Zelle einzubringen ^[18] als auch ein Protein innerhalb der Zelle zu modifizieren ^[19-24] und zu beobachten.

1.2. METHODEN ZUR MODIFIZIERUNG VON PROTEINEN

Neben den zahlreichen rein chemischen Methoden zur Proteinmodifizierung, die häufig zwar chemoselektiv aber nicht regiospezifisch verlaufen bzw. globale Modifizierungen des Proteins zur Folge haben, existieren molekularbiologische, enzymatische sowie Kombinationen aus chemischen und enzymatischen oder molekularbiologischen Methoden zur spezifischen Modifizierung von Proteinen. Im Folgenden sollen einige der wichtigsten Methoden vorgestellt werden. Nach Bertozzi *et al.* ^[25] können chemische Reaktionen, die weder mit biologischen Systemen interagieren noch interferieren als bioorthogonal bezeichnet werden. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die eingefügten funktionellen Gruppierungen sowohl inert als auch nicht giftig für Zellen bzw. Organismen sind.

Im Folgenden soll die Modifizierung von Proteinen, in Anlehnung an die vorangegangene Definition für Bioorthogonalität ^[25], in orthogonale und nicht-orthogonale Verfahren eingeteilt werden und um enzymatische Methoden in zellfreien Systemen ausgeweitet werden. Als Erweiterung der klassischen Definition soll unter der nicht-orthogonalen Proteinmodifizierung hierbei verstanden werden, dass die angewendete Methode aufgrund ihrer Eigenschaften nicht zu einer sowohl regiospezifischen als auch chemoselektiven Modifizierung eines spezifischen Aminosäurerestes in einem bestimmten Protein unter nativen Bedingungen führt. Orthogonale chemische und/oder molekularbiologische Verfahren hingegen führen unter nativen Bedingungen zu regiospezifisch und chemoselektiv modifizierten Proteinen. In der Regel sind regiospezifische Verfahren ebenso als orthogonal zu bezeichnen.

1.2.1. CHEMISCHE VERFAHREN ZUR NICHT-ORTHOGONALEN DERIVATISIERUNG VON PROTEINEN

Die in Proteinen vorkommenden verschiedenartigen nukleophilen (R-OH, R-NH₂, R-SH) und elektrophilen (R-COOH; nach entsprechender Aktivierung mittels DCC beispielsweise) Funktionalitäten der unterschiedlichen Aminosäureseitenketten lassen sich mit zahlreichen Reagenzien modifizieren. Orthogonalität kann mit dieser Methode jedoch nicht erreicht werden, da die Modifizierungsreagenzien weder positionsspezifisch noch, bis auf wenige Ausnahmen, chemoselektiv mit einem spezifischen Aminosäurerest reagieren können.

Am Beispiel des therapeutisch relevanten Polyethylenglycol soll der typische Verlauf chemischer Modifizierungen von Proteinen beispielhaft beschrieben werden. Mit PEG modifizierte Proteine haben eine verlängerte Halbwertszeit im Blutserum und unterliegen somit einer verringerten Proteolyse durch Proteasen ^[10]; die Verweildauer im Organismus und somit dietherapeutische Wirksamkeit ist somit höher.

Prinzipiell können Amine (Seitenketten der Aminosäuren Lysin- oder Arginin), Alkohole (Serin- oder Threoninreste), Carbonsäurefunktionalitäten (Glutaminsäure- oder Asparaginsäurereste), Sulfhydrylgruppen (Cysteinreste) und nicht-disulfidverbrückte Cysteine als reaktive Funktionalität zur Pegylierung von Proteinen genutzt werden. Hierbei unterscheidet man zwischen „zufälliger“ und spezifischer Pegylierung. Zufällige Pegylierung erreicht man mit entsprechend funktionalisierten Polyethylenglykolen wie PEGchlorotriazinen ^[10] oder durch Carbonyldiimidazol aktiviertes Polyethylenglycol ^[26]; ebenfalls häufig verwendet wird durch *O*-Succinimid aktiviertes Polyethylenglycol. Die genannten Reagenzien reagieren hauptsächlich mit dem Stickstoff der Lysinseitenkette; es kommt aber auch zur Reaktion mit anderen Proteinnukleophilen wie der *N*-terminalen Aminogruppe, der reaktiven Seitenketten von Serin, Threonin (*O*-Nukleophil) und Cystein (*S*-Nukleophil). Die Derivatisierung erfolgt somit weder chemoselektiv noch regiospezifisch. Neben Polyethylenglycol werden auch andere Agentien wie ganze Enzyme mit Immunglobulinen mit vergleichbaren chemischen Methoden konjugiert ^[27]. Bei der chemoselektiven Pegylierung soll es nur zur Reaktion mit einer spezifischen Aminosäureseitenkette wie beispielsweise Cystein kommen ^[28]. Dabei wird Maleinimid-PEG verwendet, welches in einer Additionsreaktion nahezu ausschließlich mit den Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten reagiert. Sind jedoch mehrere Sulfhydrylgruppen in dem zu modifizierenden Protein enthalten, werden diese ebenfalls alle mit PEG modifiziert; somit wäre die Modifizierung in diesem Fall chemoselektiv jedoch nicht regiospezifisch. Eine regiospezifische Pegylierung ist somit auch mit dieser Methode nur in Ausnahmefällen etwa durch die Einführung eines einzelnen Cysteinrestes zu erreichen.

Eine weitere Möglichkeit zur chemoselektiven Modifizierung ist die globale Modifizierung aller Tryptophanseitenketten in einem Protein mit Hilfe sogenannter Rhodiumcarbenoide ^[29]. Diese Reaktion ist jedoch in der Regel nur unter denaturierenden Bedingungen und nicht regiospezifisch durchführbar, da mit dieser Methode alle Tryptophanreste eines Proteins derivatisiert werden. Eine weitere Variante der chemischen Modifizierung von Proteinen stellt die Modifizierung von Tyrosinseitenketten dar. Hierbei wird in einer der Mannichreaktion ^[30] ähnlichen Reaktion ein Anilinderivat mit Formaldehyd zu einer Schiff'schen Base umgesetzt. In einer elektrophilen Substitutionsreaktion reagiert dieses Iminiumion nachfolgend mit Tyrosinseitenketten eines Proteins ^[31, 32]. Auch diese Reaktion verläuft zwar chemoselektiv jedoch nicht regiospezifisch.

Proteine lassen sich, ebenfalls chemoselektiv, an Tyrosinresten mit Diazodicarboxamiden^[33] im Zuge einer der Michael-Addition ähnlichen Reaktion modifizieren. Die bereits genannten Funktionalitäten unterschiedlicher Aminosäuren können somit zur gezielten chemoselektiven jedoch nicht regiospezifischen Modifizierung von Proteinen genutzt werden.

1.2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE VERFAHREN ZUR NICHT-ORTHOGONALEN

DERIVATISIERUNG VON PROTEINEN

Neben den bereits beschriebenen chemischen Verfahren zur Modifizierung von Proteinen existieren Methoden, um auf molekularbiologischem Weg Proteine mit nicht proteinogenen Aminosäuren zu versehen, die dann beispielsweise auf chemischem Weg final modifiziert werden können. Eine Möglichkeit besteht dabei in der Verwendung auxotropher Bakterienstämme, die die Fähigkeit verloren haben spezifische Aminosäuren biosynthetisch herzustellen. Diese Bakterienstämme bezeichnet man als auxotrophe Mutanten. Dieser Umstand kann ausgenutzt werden, um die fehlenden Aminosäuren durch entsprechende Derivate bzw. sog. Aminosäureisostere zu ersetzen. Dies ist möglich, da die für die Beladung der t-RNA zuständigen, eigentlich sehr substratspezifischen Aminoacyl-t-RNA Synthetasen, einer gewissen Promiskuität unterliegen, die dazu führt, dass vereinzelt auch nicht kanonische Aminosäuren erkannt werden^[34]. Als Beispiele wären das Norleucin^[35], Ethionin^[36], Azatryptophan^[37] oder Triazolalanin^[38, 39] zu nennen, welche in Proteine eingebaut werden, wenn sie anstelle der entsprechenden natürlichen Aminosäuren dem Nährmedium beigegeben werden. Diesen Ansatz bezeichnet man als auxotrophen oder sogenannten SPI-Ansatz („selective pressure incorporation“) zur Einführung nicht proteinogener Aminosäureisostere bzw. Aminosäurederivate in Proteine. Als Nachteil erweist sich hier der Umstand, dass man bei diesem Ansatz auf das Vorhandensein auxotropher Mutanten angewiesen ist, welche nur mit einigem Aufwand identifiziert werden können. Zudem kommt es bei dieser Vorgehensweise zum globalen Aminosäureaustausch im gewünschten Zielprotein. Bei dieser Methode muss vorausgesetzt werden, dass die zugesetzten Aminosäureanaloga nicht toxisch für den Wirtsorganismus sind, was häufig nicht der Fall ist^[34, 35, 39]. Des Weiteren kommt es mit dieser Methode oftmals zu einem nicht vollständigen Austausch der gewünschten Aminosäure im Zielprotein. Letzteres Problem konnte erst gelöst werden, nachdem extrachromosomale, induzierbare Plasmide zur Expression einzelner Proteine eingesetzt wurden. Nach einer initialen Wachstumsphase mit der entsprechenden kanonischen Aminosäure wurde nach deren Verbrauch die dazu isostere Aminosäure zugesetzt und gleichzeitig die Expression des Zielproteins mittels geeigneter Methoden induziert. Somit konnte beispielsweise Methionin in rekombinant gewonnenem Annexin V durch ein entsprechendes Expressionssystem und der Anpassung der Wachstumsbedingungen nahezu vollständig durch Isostere wie Norleucin o. ä. ersetzt werden^[40]. Den Einbau eines größeren Spektrums an Aminosäureanaloga erlaubt die Mutation von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen hin zu einer erweiterten Substratspezifität; somit ist man nicht mehr auf die vergleichsweise geringe Substratspezifität nativer Aminoacyl-tRNS-Synthetasen angewiesen^[41].

1.2.3. REGIOSPEZIFISCHE VERFAHREN ZUR MODIFIZIERUNG VON PROTEINEN

Eine regiospezifische bzw. orthogonale Modifizierung von Proteinen kann nur in Ausnahmefällen (beispielsweise bei Ausnutzung nativ vorhandener Cysteine) ohne vorherige Manipulation des entsprechenden Proteins auf genetischer Ebene stattfinden. So werden beispielsweise Erkennungssequenzen zur späteren enzymkatalysierten Modifizierung auf genetischer Ebene in die Proteinsequenz integriert, mit Hilfe derer die regiospezifische Modifizierung in einem späteren

Schritterfolgen kann (die Position der eingeführten Markierung wird hierbei durch die Lage der Erkennungssequenz festgelegt). Sollen zusätzlich chemisch weiter modifizierbare Funktionalitäten verwendet werden so können diese somit als Aminosäureisostere während der Translation, aber auch auf enzymatischem Wege als beliebig weiter funktionalisierbare, chemische Anker eingefügt werden.

1.2.3.1. Molekularbiologische Verfahren

Neben dem Ansatz des globalen Austauschs von Aminosäuren durch nicht codogene Isostere bzw. Analoga existieren Methoden zum regioselektiven Austausch von Aminosäuren durch sowohl kanonische Aminosäuren (*site directed mutagenesis*) als auch nicht kanonische Aminosäuren. Die regiospezifische Mutagenese erfolgt auf genetischer Ebene; durch den Austausch einzelner Basen wird erreicht, dass die gewünschte Aminosäure an der entsprechenden Position in das Protein integriert wird. Diese kann dann in weiteren, beispielsweise chemischen Verfahren final funktionalisiert werden. Diese Methode ermöglicht ebenfalls die *N*- oder *C*-terminale Fusion von Proteinen mit anderen Proteinen wie beispielsweise dem GFP (green fluorescent protein)^[42]. Eine weitere Möglichkeit ist die Integration nicht nativer Aminosäuren bzw. Aminosäureanaloga in Zielproteine. Neben der bereits beschriebenen auxotrophen Methode, die global mit der nicht nativen Aminosäure modifizierte Proteine zur Folge hat, existieren ebenfalls Methoden zum regioselektiven Einbau von Aminosäureanaloga in Proteine. Diese nutzen den Umstand, dass ein Stopp-Codon, welches normalerweise die Proteinbiosynthese unterbricht zum Einbau nicht proteinogener Aminosäuren genutzt werden kann. Diese Stopp-Codone können von Suppressor tRNSs erkannt werden und führen dann zum Einbau einer Aminosäure sowohl *in vivo* als auch *in vitro*^[43]. Zum Zweck des Einbaus nicht proteinogener Aminosäuren können Suppressor-tRNSs aus Hefen beispielsweise in fremden Wirtsorganismen wie *E. coli* verwendet und nach einer Mutation der Anticodonschleife chemisch mit einer nicht kanonischen Aminosäure beladen werden. Die Verwendung chemisch acylierter tRNS führt somit zu einem regiospezifisch, mit einer nicht codogenen Aminosäure modifizierten Protein^[44]. Mit Hilfe dieser Methode gelang beispielsweise eine simultane doppelte Modifizierung von Streptavidin mit zwei unterschiedlichen isosteren Aminosäuren^[45] oder die Einbringung nicht-nativer Aminosäuren in *E.coli*-Proteine als Dienophil für Diels-Alder Reaktionen^[46].

Trotz der vielseitigen Möglichkeiten der Modifizierung bietet diese Strategie noch immer einige wesentliche Nachteile: Eine limitierte Ausbeute, zumindest im Fall der Verwendung von zellfreien Expressionssystemen^[47], und vor allen Dingen ein großer Optimierungsbedarf der Expressionssysteme und Bedingungen. Zudem variiert die Suppressionseffizienz^[47] stark in Abhängigkeit von der „Natur“ der isosteren Aminosäure, wobei deren Stereochemie, Polarität und Geometrie^[48] eine entscheidende Rolle spielen. Diese Limitationen schränken diese Methode sehr ein und machen somit eine generelle Anwendbarkeit zur Modifizierung von Proteinen zumindest aufwendig.

Um dieses *in vitro*-System auf *in vivo* Systeme zu übertragen, müssen passende Aminoacyl-tRNS-Synthetasen gefunden werden, die ausschließlich die entsprechende Suppressor-tRNS erkennen und somit orthogonal zu dem zelleigenen Proteinbiosynthesekomplex sind. Hierzu kann auf die Verwendung zellfremder tRNS-Aminoacyl-tRNS-Synthetasepaare zurückgegriffen werden. Durch die genetische Veränderung der entsprechenden Aminoacyl-tRNS-Synthetase konnte diese dahingehend verändert werden, dass sie ausschließlich eine bestimmte, nicht kanonische Aminosäure erkennt und an der entsprechenden Position im Protein einbaut^[49]. Mit dieser Methodik konnte der genetische Code von *E.coli* erweitert werden. In einem weiteren Schritt könnten die so eingebauten

Aminosäurederivate chemisch funktionalisiert werden. Problematisch bei diesem Ansatz ist aber weiterhin der große Aufwand und die vergleichsweise geringe Ausbeute an modifiziertem Protein.

1.2.3.2. Enzymatische Verfahren

Enzymatische Verfahren zur Modifizierung von Proteinen nutzen intrinsische Eigenschaften von Enzymen wie beispielsweise die Erkennung bestimmter Aminosäuresequenzen oder Funktionalitäten nach Einführung der entsprechenden Erkennungssequenzen mittels der ortsgerichteten Mutagenese. Regio- bzw. Chemospezifität wird hierbei durch die hohe Substratspezifität der jeweiligen Enzyme erzeugt. Die Regiospezifität einzelner Enzyme ist ausschließlich abhängig von der nativ oder künstlich in ein Protein eingebrachten Erkennungssequenz. Besteht diese wie im Fall der Transglutaminase nur aus einem Glutaminrest so kann nicht von einer Regioselektivität sondern vielmehr von einer chemoselektiven Modifizierung durch dieses Enzym gesprochen werden^[50]. Alle anderen nachfolgend aufgeführten Enzyme zur Modifizierung von Proteinen benötigen eine umfassendere, aus mehreren Aminosäuren bestehende Erkennungssequenz. Der Umstand, dass jedes so modifizierte Proteine nur über eine Erkennungssequenz verfügt, verleiht der Methode somit einen sowohl regio- als auch chemoselektiven Charakter, da in der Regel nur eine Aminosäure innerhalb einer Konsensussequenz modifiziert wird. Zu diesem Zweck können sowohl Dehalogenasen^[21, 51], Biotin Ligase^[52, 53], Fettsäureligase^[19], Phosphopantethenyl-Transferase^[54, 55], Sortase^[56, 57], Myristoyltransferase^[20], Proteinfarnesyltransferase^[58] als auch das Formylglycin generierende Enzym^[59] aber auch spezielle (bakterielle) Transglutaminasen^[60] und die Klasse der Proteasen verwendet werden. Im Fall der bereits kommerziell erhältlichen Dehalogenasentechnologie (HaloTag) wird die, für die spätere Modifikation verantwortliche, modifizierte Dehalogenase ähnlich wie im Fall des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) auf genetischer Ebene mit dem Zielprotein fusioniert. Die katalytische Aktivität der Dehalogenase führt dann durch Erkennung modifizierter Alkylhalogenide zu dessen kovalenter Modifizierung. Ähnlich wie die Dehalogenase erkennen sowohl die Biotin Ligase als auch die Phosphopantethenyl-Transferase, die Fettsäureligase, die Myristoyltransferase und die Proteinfarnesyltransferase spezifische chemische Strukturen. Mit diesen Enzymen können dann Aminosäureseitenketten innerhalb einer peptidischen Erkennungssequenz mit dieser chemischen Struktur wie etwa einem Farnesylrest im Fall der Farnesyltransferase modifiziert werden. Eine Ausnahme bildet das Formylglycin generierende Enzym. Dieses erzeugt den Aldehyd Formylglycin durch Oxidation eines innerhalb einer Konsensussequenz liegenden Cysteins, welcher dann chemoselektiv (beispielsweise durch Bildung einer Schiff Base) final modifiziert werden kann. Sowohl Proteasen als auch Sortasen erkennen beinahe ausschließlich peptidische Sequenzen (Acyldonor und Acylakzeptor), die dann durch eine Kondensationsreaktion miteinander kovalent verbunden werden können.

Durch eine gezielte Kombination chemischer, molekularbiologischer und enzymatischer Verfahren kann somit eine sowohl positionsspezifische als auch chemoselektive Markierung erreicht werden, die weitere nahezu unbegrenzte Modifizierungsmöglichkeiten bietet. Im Weiteren soll die proteasekatalysierte Modifikation von Proteinen, die Gegenstand dieser Arbeit ist, detaillierter beleuchtet werden.

Proteasekatalysierte Modifizierung von Proteinen

Bei der nativen Funktion von Proteasen, der Spaltung von Peptidbindungen, handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, wobei das Gleichgewicht weit auf der Seite des Hydrolyseprodukts liegt.

Demnach müssen zur Derivatisierung von Peptiden und Proteinen mit Hilfe der Enzymklasse der Proteasen Bedingungen gefunden werden, die es der Protease ermöglichen, die Rückreaktion der Hydrolyse spezifischer Peptidsequenzen zu bevorzugen. Hierbei stehen prinzipiell zwei mögliche Wege der Reaktionsführung zur Verfügung: die thermodynamische Kontrolle (gleichgewichtskontrolliert) und die kinetische Kontrolle einer proteasekatalysierten Ligationsreaktion.

Bei der thermodynamisch kontrollierten Ligationsreaktion handelt es sich um die direkte Rückreaktion der Proteolyse, welche durch die Verwendung organischer Lösungsmittel wie Acetonitril, Methanol, Glycerol, DMSO oder DMF beeinflusst werden kann. Die mögliche Verbesserung des Verhältnisses von Aminolyse zu Hydrolyse wird zum einen durch den Ausschluss von Wasser aus dem aktiven Zentrum und zum anderen durch die Einflussnahme des (organ.) Lösungsmittels auf den Ionisierungsstatus der α -Carboxylatgruppe der zu ligierenden Acyl-Komponenten erreicht. Diese Art der Reaktionsführung erweist sich durch die geringe Reaktionsgeschwindigkeit und den großen Enzymbedarf als nachteilig^[61, 62]. Darüberhinaus spielen die verwendeten Konzentrationen der zu ligierenden Reaktanden im Rahmen des Massenwirkungsgesetzes eine nicht unerhebliche Rolle.

Die Verwendung von Peptidestern für den Acyltransfer auf andere Peptidderivate wird als kinetisch kontrollierte (Peptid-) Synthese bezeichnet. Voraussetzung für eine kinetisch kontrollierte Reaktionsführung ist die intermediäre Ausbildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediats während der Katalyse. Diese kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate werden ausschließlich bei Serin- und Cysteinproteasen vorgefunden und können von Wasser und vielfältigen Acylakzeptoren (Nukleophilen) deacyliert werden^[63]. Sie bieten somit für diese Proteasen die Möglichkeit einer Peptidligation als Konkurrenzreaktion zu der entsprechenden Hydrolyse (Abbildung 1). Ist $k_2 \gg k_3 + k_4$ so liegt eine Ligation unter kinetischer Kontrolle vor. Das Ligationsprodukt kann hierbei deutlich höhere Ausbeuten erreichen als bei einer entsprechenden thermodynamischen Kontrolle^[64].

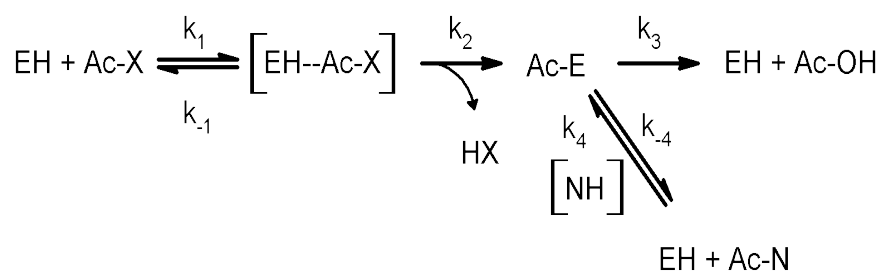


Abbildung 1. Schema der proteasekatalysierten Acyltransferreaktion. Freies Enzym EH und Acyl-Donor Ac-X bilden den Michaelis-Komplex [EH·Ac-X] und das Acyl-Enzym-Intermediat Ac-E. Dieses kann entweder zu Ac-OH hydrolysiert oder von einem anderen Nukleophil [NH] angegriffen werden. Die Rückreaktion (k_{-4}) führt zur Produkthydrolyse (Sekundärhydrolyse). Ac: Acyl-Rest; NH: Nukleophil

Vergleicht man thermodynamisch kontrollierte mit kinetisch kontrollierten, proteasekatalysierten Ligationsreaktionen so überwiegen in der Regel die Vorteile der kinetisch kontrollierten Reaktion. Zwar kann die thermodynamisch kontrollierte Reaktion prinzipiell von jeder Protease katalysiert werden; die zur Unterdrückung der Ionisierung der α -Carboxylatgruppe benötigte hohe Konzentration an organischem Lösungsmittel resultiert jedoch in einer geringen Reaktionsgeschwindigkeit verbunden mit einem hohen Enzymbedarf, weswegen i.d.R. die kinetisch kontrollierte Reaktionsführung zu bevorzugen ist. Die kinetisch kontrollierte Ligationsreaktion kommt mit deutlich geringeren

Konzentrationen an organischem Lösungsmittel und Enzym aus; sie erzielt somit deutlich höhere Produktausbeuten als das thermodynamisch kontrollierte Pendant ^[62].

Trypsin ist eine Serinprotease, welche spezifisch carboxyterminal von basischen Aminosäureresten schneidet. Das aktive Zentrum setzt sich aus Ser195, Asp102 und His57 (katalytische Triade) zusammen. Dabei bildet Ser195 ein Acyl-Enzym-Intermediat mit dem zu spaltenden Substrat und ist somit maßgeblich an der Reaktivität der Protease beteiligt. Dieses Acyl-Enzym-Intermediat ist durch variable Nucleophile wie Wasser (native Peptidhydrolyse) aber auch Amine, Alkohole oder Thiole angreifbar. Durch die Ausbildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediats erfüllt die Serinprotease Trypsin somit alle Voraussetzungen für einen kinetisch kontrollierten Acyltransfer. Einzig die zu erwartende Hydrolyse (Sekundärhydrolyse) nach erfolgter Ligation (carboxyterminal von Arginin und Lysin im Falle des nativen Trypsins) ist bei Verwendung von nativem Trypsin zu beachten.

Unabhängig von der jeweiligen Reaktionsführung (kinetisch oder thermodynamisch) handelt es sich bei der Peptidbindungsknüpfung um eine Zwei-Substrat-Reaktion. Der Acyldonor bindet am S-Bindungsort des Enzyms, während der Acylakzeptor mit der S'-Bindungsregion interagiert. Daher ist die Effizienz des nucleophilen Angriffs durch die Aminokomponente und damit die Effizienz der Acyltransferreaktion von der optimalen Wechselwirkung mit den S'-Bindungsstellen des Enzyms abhängig. Das Verhältnis zwischen Hydrolyse und Aminolyse ist somit eine direkte Folge der S'-Bindungsortspezifität einer Protease zum Acylakzeptor und bestimmt demnach wesentlich die Ausbeute an gewünschtem Peptidprodukt.

Das Verhältnis zwischen Hydrolyse und Aminolyse einer Peptidligationsreaktion kann durch rationales Enzym-Design und die Entwicklung von Trypsinvarianten durch ortsgerichtete Mutagenese verbessert werden. Zum einen geschieht das durch eine Verminderung der proteolytischen Aktivität von Trypsin und zum anderen durch Erhöhung der S'-Bindungsortspezifität.

Trypsinvarianten

Um unerwünschte proteolytische Nebenreaktionen (Sekundärhydrolyse) bei der Trypsin-katalysierten Peptidbindungsknüpfung zu verhindern und demnach die Ausbeute an Ligationsprodukt zu erhöhen, wurde die Spezifität in S₁-Position zum nativen Substrat herabgesetzt, indem das Aspartat D189 (S₁) gegen die basische Aminosäure Lysin ausgetauscht wurde ^[65]. In dieser Position ist Aspartat maßgeblich für die Erkennung der nativen Aminosäure in P₁-Position (Lysin, Arginin) im nativen (d.h. Wildtyp-)Trypsin ^[66]. Der Austausch des Aspartat-Restes gegen die basische Aminosäure Lysin an dieser Position im Trypsin hat nun zur Folge, dass Arginin bzw. Lysin in der P₁ Position nicht mehr eingebunden werden können, wodurch die native proteolytische Aktivität vermindert wird. Der Austausch in dieser Position (P₁) führt stattdessen zu einer Spezifität für aromatische oder aliphatische Strukturen mit negativ geladener Carboxylatgruppe (z.B. p-Carboxyphenylester der 5-Hydroxy-indolcarbonsäure) ^[67]. Tauscht man das positiv geladene Lysin 60 gegen ein negativ geladenes Glutamat verlagert sich ändert sich die S₁' Spezifität des Trypsins von hydrophoben Aminosäuren hin zu den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin; darüberhinaus werden aufgrund dieses Austauschs Guanidinphenylester akzeptiert. Es entsteht somit eine neue Bindungstasche in S₁' mit einer Spezifität für die genannten basischen Funktionalitäten. Die Kombination beider Mutationen K60E und D189K in einer einzigen Trypsinvariante (Tn D189K/K60E) führt zu einer proteolytisch nahezu inaktiven Trypsinvariante, welche sich für synthetische Zwecke eignet ^[65].

Um die Syntheseeffizienz weiter zu erhöhen ist es notwendig die Akzeptanz bzw. die Erkennung von Substraten im S'-Bereich (Acylakzeptor bzw. Nukleophil) zu erhöhen. Die Einführung von Histidinresten in den Bindungstaschen S₁' und S₃' von Trypsin ermöglicht eine übergangsmetallinduzierte Erkennung von Histidinresten in der Position P₂' eines Substrats^[68]. Übergangsmetallionen wie Zink(II)^[68] oder Nickel(II)^[69] vermitteln hierbei über eine Komplexbildung die Einbindung des Nukleophilsubstrats in den S'-Bereich der Trypsinvariante. Diese histidinvermittelte Erkennung von Nukleophil-Substraten ermöglicht eine entscheidende Erhöhung der Effizienz der proteasekatalysierten Ligationsreaktion. Die Kombination der Mutationen K60E, D189K, N143H und E151H führt zu der Trypsinvariante K60E/D189K/N143H/E151H (Trypsiligase)^[69-71].

Zusammenfassend wurde die Optimierung erreicht, indem die Aminosäureerkennung im S'-seitigen Bereich des Enzyms wesentlich verbessert wurde während gleichzeitig die Proteolyseaktivität durch Änderungen im S-Bereich (D189K) verringert werden konnte. Die optimierte Erkennungssequenz für die Trypsiligase lautet somit **-YRH-**, wobei die Bindungsspaltung zwischen Tyrosin und Arginin (also S₁ und S₁') erfolgt.

Durch den Einsatz sogenannter Substratmimetika sind Serin- und Cysteinproteasen im Rahmen der kinetisch kontrollierten Peptidligation prinzipiell in der Lage, beliebige strukturelle Elemente mit einem Peptid oder Protein unabhängig von der Natur des individuellen Acylrestes zu verknüpfen. Ein Substratmimetikum^[72, 73] ahmt natürliche Substrate von proteolytischen Enzymen wie beispielsweise Trypsin oder Chymotrypsin nach. Dabei „erkennt“ die Protease ausschließlich die Esterabgangsgruppe und nicht wie bei einem Standardsubstrat den Acylrest. Dabei vermittelt die Esterabgangsgruppe (P') die Ausbildung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediats mit der Protease, welches zum Beispiel von einem Erkennungspeptid (histidinvermittelte Erkennung) deacyliert werden kann. Somit gelingt die Integration strukturfremder Elemente in Peptide und Proteine. Vergleicht man ein Substratmimetikum mit einem gewöhnlichen Estersubstrat einer Protease (Abbildung 2 B) so liegt der Unterschied in der Position der spezifitätsbestimmenden Gruppierung. Während die spezifitätsdeterminierende Gruppierung eines Substratmimetikums in der Esterabgangsgruppe liegt, befindet sich die spezifitätsdeterminierende Gruppierung eines herkömmlichen Estersubstrates in P₁-Position des Acylrestes. Dementsprechend binden sowohl das Standardsubstrat als auch das Substratmimetikum in der S₁-Tasche des Enzyms (Abbildung 2A). Als prominentes Beispiel eines solchen Substratmimetikums für die Arginin-spezifische Protease Trypsin sowie die aromatspezifische Protease Chymotrypsin ist der 4-Guanidinophenylester (Abbildung 2B). Er erlaubt sowohl die Ligation von Aminosäuren (incl. nicht-proteinogener Amine) und Peptiden^[74] als auch die Modifikation von Proteinen (und Peptiden)^[70]. Der Vorgang wird als Acyl-Transferreaktion bezeichnet.

Der durch Trypsiligase katalysierte Acyltransfer zwischen dem Acyldonor Bz-Gly-OGp und dem Acylakzeptor AHAAG erreicht eine nahezu quantitative Ausbeute während die Trypsinvariante Tn K60E/D189K (hier fehlen die Austausch N143H und E151H, die für die His-Erkennung in der Position P₂' verantwortlich sind) in der gleichen Reaktion nur eine vergleichbar niedrige Ausbeute von 30% erzielt^[69]. Trypsiligase ist somit ein für die Ligation von Peptiden bzw. Proteinen an deren N- bzw. C-Terminus optimiertes Enzym. Im Folgenden soll der Mechanismus der N- und C-terminalen Modifizierung von Peptiden oder Proteinen durch Trypsiligase näher erläutert werden.

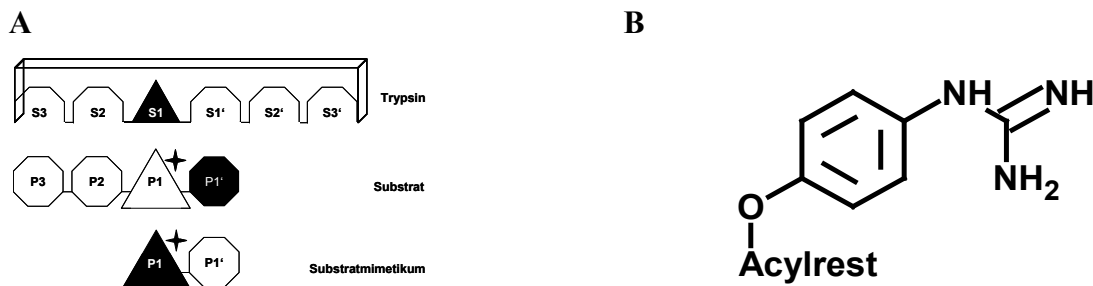
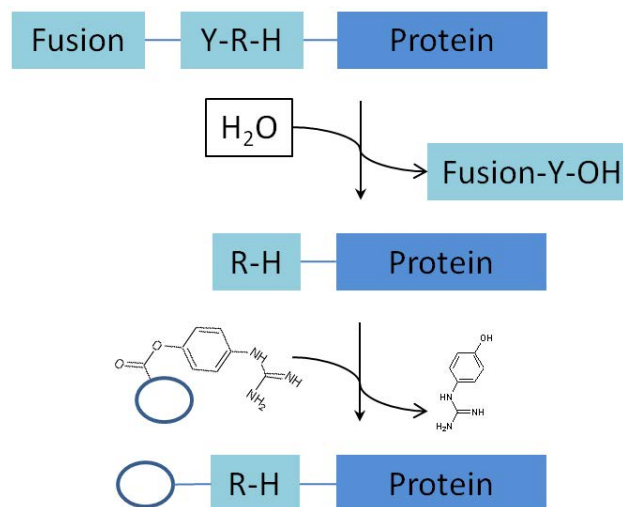


Abbildung 2. A: Vergleich der Bindung eines normalen Trypsin-Substrats und der Bindung eines Substratmimetikums. Beim normalen Substrat stellen P1 und P1' die spezifischen Aminosäuren zur Bindung an Trypsin dar; für die Spezifität des Substratmimetikums ist nur P1 notwendig. [* : Abgangsgruppe]. **B: Chemische Struktur eines Substratmimetikums vom 4-Guanidinophenylester-Typ.**

N- und C-terminale Modifizierung von Proteinen

Die *N*-terminale Modifizierung von Proteinen setzt den Einsatz von Substratmimetika als Acyldonoren und den entsprechend funktionalisierten Zielmolekülen als Acylakzeptoren voraus. In einem der eigentlichen Modifizierungsreaktion vorausgehenden Schritt wird das an *N*-terminaler Position des zu modifizierenden Proteins gelegene Fusionspeptid³ durch die Trypsinvariante proteolytisch abgespalten. Nach Acylierung des Ser195 der Trypsinvariante durch das Substratmimetikum greift in einem zweiten Schritt der *N*-Terminus des mit der Erkennungssequenz fusionierten Proteins nukleophil an, was zur Modifizierung des Zielproteins führt (Schema 1).

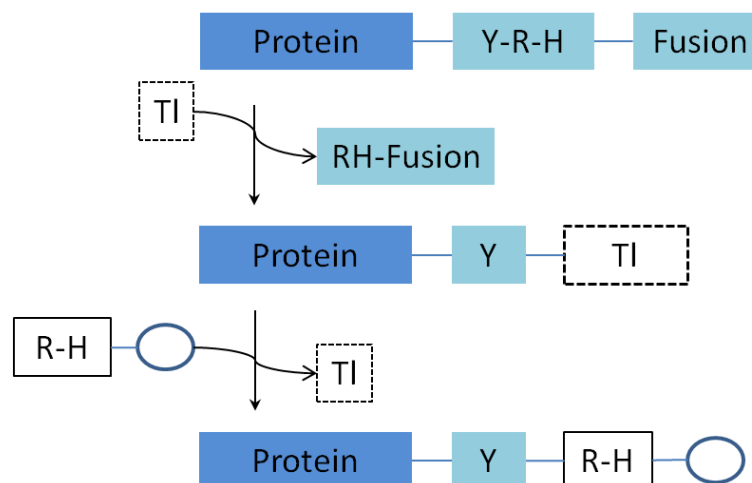


Schema 1. Schema zur *N*-terminalen, substratmimetikumvermittelten Modifikation von Proteinen durch die Trypsiligase. Nach initialer Hydrolyse der Proteinfusion wird das Protein mit dem Acylrest des OGp-Esters durch Trypsiligase verknüpft.

Die *C*-terminale Modifizierung von Proteinen erfolgt nicht auf der Grundlage von Substratmimetika sondern über eine Transamidierung. Dabei bildet das zu markierende Protein selbst mit seinem *C*-terminalen, die Erkennungssequenz tragenden Ende das Acyl-Enzym-Intermediat mit der Trypsinvariante aus, welches dann von dem modifizierten Acylakzeptor nukleophil angegriffen werden kann (Schema 2).

³ Die Proteinfusion im Fall der *N*-terminalen Modifizierung ist optional und wird i.d.R. verwendet um das zu modifizierende Protein affinitätschromatographisch zu reinigen

Anders als bei der *N*-terminalen Modifikation entsteht bei der *C*-terminalen Modifikation von Proteinen bei Verwendung der Trypsiligase die wieder hydrolysierbare Erkennungssequenz **-YRH-** (Schema 2), welche bewirkt, dass die Ausbeute an modifiziertem Zielprotein ein temporäres Maximum durchläuft.



Schema 2. Schema zur C-terminalen Modifizierung von Proteinen durch das Enzym Trypsiligase (TI). Nach Ausbildung des Acyl-Enzyms zwischen Trypsiligase und zu modifizierendem Protein kommt es zur Deacylierung durch ein modifiziertes Peptid mit der Erkennungssequenz RH am *N*-Terminus. ○: beliebige Modifikation

1.2.4. CHEMOSELEKTIVE VERFAHREN ZUR MODIFIZIERUNG VON PROTEINEN

Im Weiteren soll erläutert werden, welche Möglichkeiten bestehen, enzymatisch eingebrachte Funktionalitäten chemoselektiv und somit im Sinne der Definition bioorthogonal zu modifizieren.

Durch die Vielzahl der in einem Protein vorhandenen funktionellen Gruppen kommen prinzipiell nur wenige Reaktionstypen in Frage, die bioorthogonal zu den nukleophilen Aminosäuren sind. Die enzymatisch in ein Protein einzubringenden Funktionalitäten sollten nach diesen Kriterien ausgewählt werden.

Es entfallen fast ausnahmslos alle nukleophilen und elektrophilen Substitutionsreaktionen, da Proteine über eben diese Funktionalitäten verfügen und somit eine regiospezifische Modifikation mittels dieser Reaktionstypen erschweren. Eine Ausnahme bilden hier sowohl die Staudinger Reaktion als auch die native chemische Ligation. Bei der Staudinger Ligation reagiert ein mit einem Phosphin funktionalisiertes Peptid mit einem ebenfalls entsprechend modifizierten Azid, welches anschließend über eine Aza-Ylid Zwischenstufe nach Hydrolyse eine Peptidbindung ausbildet. Diese Reaktion kann zur Ligation von Azidkomponenten mit Elektrophilen genutzt werden ^[75, 76]. Die native chemische Ligation wird oftmals zur Synthese von Proteinen moderater Größe verwendet ^[77]. Hierbei reagiert ein Thioester (*C*-terminales Peptid) mit der Thiol-Funktionalität einer Cysteinseitenkette (die Cystein-funktionalität muss sich am *N*-Terminus des zu ligierenden Peptids befinden). In zwei aufeinanderfolgenden nukleophilen Reaktionen entsteht daraus eine Peptidbindung. Eine weitere Möglichkeit zur chemoselektiven Modifizierung bieten die vorwiegend in der nicht-wässrigen organischen Synthesechemie genutzte Heck-^[78] und Sonogashira-Kupplung ^[79]. Beide Reaktionstypen werden zur C-C-Knüpfung zwischen Halogenalkanen und Alkinen (Sonogashira Kupplung) bzw. zwischen Halogenalkanen und Alkenen (Heck Reaktion) verwendet. Als Katalysatoren werden

Palladiumverbindungen verwendet. Die Verwendung entsprechend wasserlöslicher Katalysatoren ermöglicht eine (bio-)orthogonale Modifizierung von Proteinen.

Additionsreaktionen sind ebenfalls nur bedingt zur Proteinmodifizierung anwendbar, da sie auf der Reaktion eines Nucleophils mit einem Elektrophil (Michael-Reaktion, Aldol-Reaktion, Bildung von Schiff'schen Basen) beruhen. Die bereits angesprochenen Additions- bzw. Substitutionsreaktionen an Tryptophan- oder Tyrosinseitenketten bilden ebenfalls Ausnahmen (siehe 1.2.1. Chemische Verfahren), obgleich die Voraussetzung der Orthogonalität aufgrund der notwendigen Reaktionsbedingungen und der nicht zu realisierenden Positionsspezifität nur zum Teil gegeben ist.

Ein verbleibender Reaktionstyp, der nicht in „Konflikt“ mit den in Proteinen vorkommenden Funktionalitäten steht und somit die Bedingungen der Bioorthogonalität erfüllt, ist die Gruppe der pericyclischen Reaktionen. In Betracht für Reaktionen an Proteinen kommen hierbei vor allem thermisch aktivierte Cycloadditionsreaktionen. Dabei ist zu beachten, dass diese Reaktionen nicht nur chemische Orthogonalität zu den im Protein vorkommenden Funktionalitäten aufweisen müssen, sondern auch unter Reaktionsbedingungen ablaufen sollten, die mit der eingeschränkten Stabilität von Proteinen vereinbar sind. Dazu zählen die Kompatibilität zu einem adäquaten Lösungsmittel (i. d. R. Wasser), zu moderater Temperatur und einem entsprechenden pH-Wert (Toleranzbereiche hängen stark von dem entsprechenden Protein ab). Zusätzlich sollte die Reaktion stereospezifisch (nicht notwendigerweise enantioselektiv) und quantitativ verlaufen, das Produkt stabil und leicht isolierbar sein. Die gerade gemachten Voraussetzungen zur chemischen Modifizierung von Biomolekülen decken sich mit denjenigen, die K. B. Sharpless zur Definition bzw. Voraussetzung für die sogenannte Klick-Reaktion gemacht hat ^[80]. Unter Klick-Reaktionen fasst man somit diejenigen Reaktionstypen zusammen, die die vorausgenannten Eigenschaften besitzen. Dazu gehören neben den Cycloadditionsreaktionen nucleophile Substitutionsreaktionen (hauptsächlich Ringöffnungsreaktionen heterocyclischer Elektrophile wie Epoxide und Aziridine), Carbonylchemie vom „Nicht-Aldol-Typ“ (Bildung von Harnstoffen, Thioharnstoffen, Oximethern usw.) und Additionen an C-C Mehrfachbindungen (Epoxidierungen, Dihydroxylierungen, Aziridinierungen, Michael-Reaktionen) ^[80].

Cycloadditionen werden in der organischen Chemie zur Synthese von Ringsystemen (Carbocyclen und Heterocyclen) verwendet. Dabei sind als wichtige Vertreter dieser Reaktionsklasse [4+2]-Cycloadditionen zur Synthese sechsgliedriger Ringe und [3+2]-Cycloadditionen zur Synthese fünfgliedriger Ringe zu nennen. Möglich ist auch die Synthese drei- und viergliedriger Ringsysteme durch entsprechende [1+2]- und [2+2]-Cycloadditionsreaktionen. Entscheidend für den Einsatz von Cycloadditionen zur Modifizierung von Proteinen ist jedoch, dass diese Reaktionen die unter 1.2.2.3. gemachten Voraussetzungen erfüllen und somit für Reaktionen an einem Protein zur Verfügung stehen. Bei [1+2]-Reaktionen handelt es sich um die Addition von Carbenen und Nitrenen an Olefine. Jedoch sind Carbene und Nitrene starke Elektrophile, die nicht im wässrigen Milieu- also demzufolge auch nicht am Protein verwendet werden können. [2+2]-Cycloadditionsreaktionen stellen i. d. R. photochemisch verlaufende Reaktionen dar, die jedoch nur in Ausnahmefällen an Proteinen möglich sind. Additionsprodukten Bei der [4+2]-Cycloaddition handelt es sich um die thermisch leicht verlaufende Diels-Alder-Reaktion. Diese ist im wässrigen Milieu unter proteinkompatiblen Bedingungen möglich. Die [3+2]-Cycloaddition gehört zu den 1,3-Dipoladditionen und ist ebenfalls thermisch möglich. Ein Beispiel wäre die *Huisgen* Cycloaddition ^[81] oder das im wässrigen Medium verlaufende, kupferkatalysierte Pendant: Die Sharpless Klick-Reaktion zwischen Aziden und Alkinen ^[80].

Unter Berücksichtigung der gemachten Voraussetzungen kommt man zu dem Schluss, dass sich unter den Cycloadditionen vor allem die Diels-Alder-Reaktion und die 1,3-dipolaren Cycloadditionen für Reaktionen am Protein ganz besonders eignen, da man keine der für diese Reaktionen benötigten Funktionalitäten im nativen Protein wiederfindet. Zudem sind sie unter solchen Bedingungen durchführbar, die mit der Stabilität und Funktionalität von Proteinen vereinbar sind; der Synthesaufwand für die entsprechenden Funktionalitäten ist als moderat einzustufen.

1.2.4.1. Diels-Alder Reaktionen

Bei der Diels-Alder-Reaktion handelt es sich um eine Synchronreaktion zwischen 1,3-Dienen und Alkenen, bei der 4 π -Elektronen des Diens mit 2 π -Elektronen des Dienophils 2 neue Sigma-Bindungen ausbilden. Sie ist demnach eine $[\pi 4 + \pi 2]$ -Cycloaddition. Alle an der Reaktion beteiligten Bindungen werden in der Regel gleichzeitig (synchron) und formal kreisförmig verschoben^[82]. Die Diels-Alder-Familie^[83] der Cycloadditionsreaktionen lässt sich einteilen in Reaktionen mit normalem, inversem und neutralem Elektronenbedarf^[84, 85]. Der Elektronenbedarf bezieht sich hierbei auf das Dien oder das Dienophil. Im Normalfall liegt das Dien als elektronenreiche Komponente vor, wohingegen es sich bei dem Dienophil um eine elektronenarme Komponente handelt. Dieser Befund wird als *Alder-Regel* bezeichnet^[86-88]. Diese Regel besitzt jedoch keine allgemeine Gültigkeit, da es sich bei Diels-Alder-Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf genau andersherum verhält. Hier liegt ein elektronenarmes Dien vor, welches mit einem elektronenreichen Dienophil reagiert. Als Dienkomponente dienen hierbei beispielsweise Hexafluorcyclopentadiene^[89], Thiophen-1,1-dioxide^[90] oder 1,2,4,5-Tetrazine^[91-93]. Als Dienophile kommen Styrene, Norbornene, Isonitrile⁴ oder *trans*-Cyclooctene in Betracht^[90, 94-96]. Alle, für die Diels-Alder-Reaktion geeigneten Diene (mit Ausnahme der Isonitrile) zeichnen sich durch eine Gemeinsamkeit aus: nur cisoide Konformere der Dienkomponente können eine Dienaddition eingehen^[97].

1.2.4.2. 1,3-dipolare Cycloadditionen

Die Reaktion eines 1,3-Dipols mit einem Mehrfachbindungssystem, dem Dipolarophil, bezeichnet man als 1,3-dipolare Cycloaddition. Bei dem Dipolarophil kann es sich um eine beliebige Doppel- oder Dreifachbindung handeln. Die 1,3-Dipole sind Verbindungen, bei denen 4 π -Elektronen über 3 Atome verteilt vorliegen. Hierbei tritt an erster und dritter Stelle eine formal formulierbare positive bzw. negative Ladung auf^[98]. Hierbei kann zwischen metallkatalysierten Dipoladditionen (auf die im nächsten Kapitel weiter eingegangen werden) und nicht-katalysierten Reaktionen unterschieden werden. Nicht-metallkatalysierte Dipoladditionen laufen nur unter bestimmten Voraussetzungen bei moderaten Bedingungen ab; so müssen die dipolarophilen Verbindungen besonders elektronenarm sein („strain promoted“). Hierauf wird in Abschnitt 6.3.2. näher eingegangen.

1.2.4.3. Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition an Alkine (Klick-Reaktion)

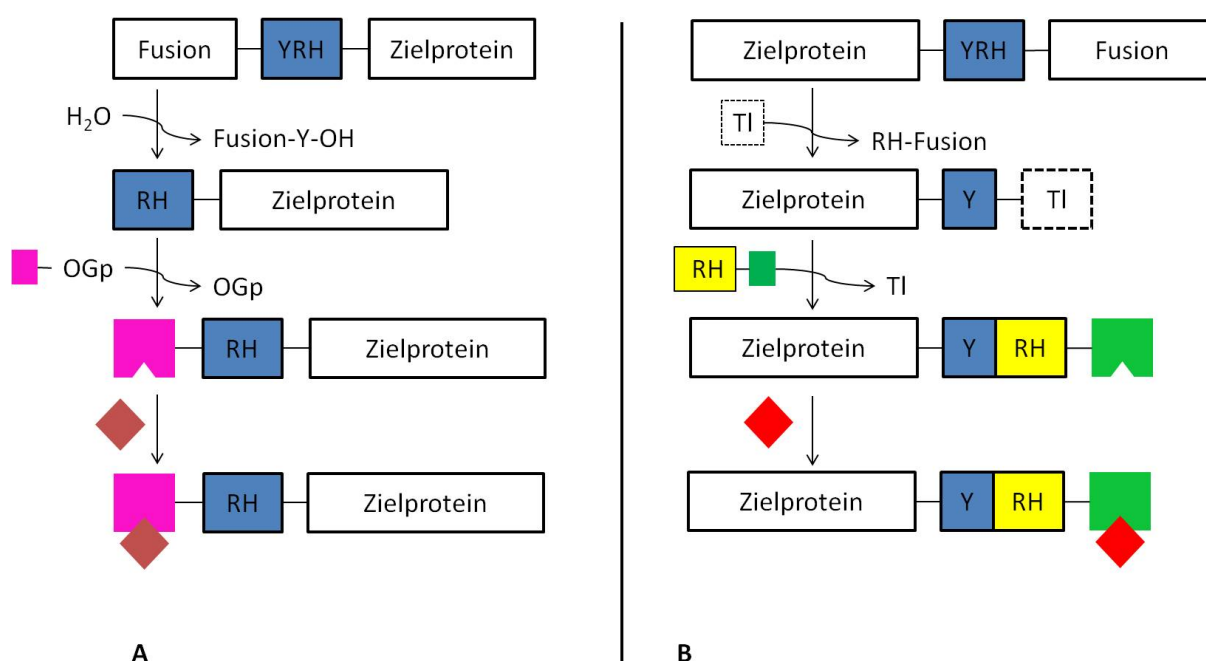
Das Kupfer-katalysierte Pendant zur unkatalysierten Triazolbildung aus Aziden und Alkinen nach Huisgen^[81, 98, 99], bei der ein Gemisch aus 1,5- und 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazoladdukten entsteht, wurde 2001 erstmals beschrieben^[100-102]. Die sogenannte Klick-Reaktion verläuft chemospezifisch und führt ausschließlich zur Bildung von 1,4-disubstituierten Addukten zwischen Aziden und

⁴ Bei der Reaktion von Tetrazinen mit Isonitrilen handelt es sich um eine $[4+1]$ Cycloaddition, welche in einem zweiten Schritt über eine $[4+2]$ Cycloreversion zu dem gewünschten Reaktionsprodukt führt.

terminalen Alkinen. Zur Katalyse können sowohl direkt Cu(I)-Verbindungen wie CuBr oder CuI als auch Cu (II) Verbindungen wie CuSO₄ verwendet werden, die dann *in situ* zu Cu (I) reduziert werden. Als Reduktionsmittel dient hierbei in der Regel elementares Kupfer oder Ascorbinsäure bzw. Na-Ascorbat ^[102]. Auch andere komplex vorliegende Kupferverbindungen katalysieren die Reaktion zwischen terminalem Alkin und Azid; mit komplex vorliegenden Kupferkatalysatoren (*N*-heterocyclische Carbenliganden) können zudem Triazole aus Aziden und internen Alkinen gebildet werden ^[103]. Zur Erleichterung der Bildung des Cu-Acetylids wird oftmals eine Base eingesetzt. Zum Schutz vor Reoxidation bzw. Disproportionierung, etwa durch vorhandenen Sauerstoff im Reaktionsansatz, kann ein Ligand verwendet werden, der Cu (I) Spezies stabilisiert. Hierfür können TBTA ^[104], das wasserlösliche THPTA ^[105] aber auch Histidinderivate ^[106] zum Einsatz kommen. Als Lösungsmittel dienen beispielsweise Alkohole, wie *tert.* Butanol, Wasser oder Mischungen aus Wasser und Alkohol. Die Reaktion findet in der Regel bereits bei Raumtemperatur mit hinreichender Geschwindigkeit statt und eignet sich somit für Reaktionen an Biomolekülen.

2. ZIELSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung geeigneter Methoden zur regio- und chemoselektiven Derivatisierung von Proteinen. Eine Kombination aus Protease-Katalyse und chemischer Reaktion sollte der gezielten Derivatisierung sowohl der *N*- als auch der *C*-Termini ausgewählter Biomoleküle unter Erhalt der Funktionalität dienen. Zur *N*- und *C*-terminalen Proteinmodifizierung sollte in einem initialen Schritt selektiv, katalysiert durch verschiedene Trypsinvarianten, ein weiter derivatisierbares Molekül als chemischer Anker eingebracht werden. Diese enzymkatalytisch in das Protein eingeführte Verbindung sollte mit Hilfe im Rahmen dieser Arbeit synthetisierter Moleküle chemisch final weiter funktionalisiert werden (Schema 3). Die hierzu notwendigen Methoden sollten gängigen chemischen Methoden nachempfunden und den Anforderungen der wässrigen Proteinchemie angepasst werden. Hierzu sollte in der Hauptsache die von K. B. Sharpless et al.^[80] entdeckte und publizierte „Klick-Reaktion“ Anwendung finden. Die notwendigen Reaktanden, wie Azid-, Alkin-, Alken- und Tetrazinderivate sollten eigens hierfür synthetisiert werden.



Schema 1. Allgemeines Verlaufsschema zur sequentiellen, enzymatischen und chemischen C- und N-terminalen Modifizierung von Proteinen durch Trypsiligase. A: N-terminale enzymatische und chemische Modifizierung B: C-terminale enzymatische und chemische Modifizierung. ■/■ enzymatisch einführbare Modifizierung; ◆/◆ chemische Modifizierung. TI: Trypsiligase

Zur initialen *N*- bzw. *C*-terminalen Modifizierung der Biomoleküle galt es im Rahmen dieser Arbeit die bereits von Dr. S. Liebscher etablierte Trypsiligase^[69-71] zu nutzen, welche hochspezifisch die Erkennungssequenz -YRH- zwischen den Aminosäuren Tyrosin und Arginin in Gegenwart von Zinkionen hydrolysiert.

Zur weiteren enzymatischen Funktionalisierung der ausgewählten Proteine sollte neben diesem bereits vorhandenen Enzym eine weitere Trypsinvariante verwendet werden, die eine alternative Erkennungssequenz aufweist und somit in Kombination mit der erstgenannten Trypsinvariante eine sowohl C- als auch N- terminale Modifizierung der Biomoleküle erlaubt^[107]. Während Trypsinligase in der Lage ist, Histidinseitenketten zinkioneninduziert in P₂'-Position eines Peptides mit der Spaltstelle -Tyr-Arg-His- zu erkennen sollten mittels rationalen Designs weitere Trypsinvarianten mit restriktiver Histidin S₃'-Spezifität erzeugt werden. Diese Variante(n) galt es unter Verwendung entsprechender Substrate detailliert zu charakterisieren.

3. MATERIALIEN

3.1. CHEMIKALIEN UND HARZE

Alle verwendeten Chemikalien und Reagentien entsprachen der höchsten verfügbaren Reinheit und wurden von Iris Biotech GmbH (Marktrechwitz), Acros Organics (Geel, Belgien) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) erworben. DM1 wurde von CONCORDIS (San Diego, USA) erworben.

Harze für die Peptidsynthesen wurden von der Iris Biotech GmbH (Marktrechwitz) kommerziell bezogen. Als Harz für alle Peptidsynthesen wurde das „Barlos-Harz“ (2-Chlortrityl Harz) verwendet.

Platten für den ELISA wurden von Nunc (Thermo Fisher Scientific, Germany) erworben.

3.2. OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE

Oligodesoxyribonukleotide (Primer) für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden bei der MWG Biotech AG (Martinsried) kommerziell erworben.

Tabelle 1. Verwendete Oligodesoxyribonukleotide für die Polymerasekettenreaktion [107].

Sequenz	Mutation	Anlagerung [°C]	Additiv
vor: 5'-CCCTGAACCTCTGGCCACCACTTCTGTGGAGG-3' rück: 5'- CCTCCACAGAAGTGGTGGCCAGAGTTCAGGG-3'	Y39H	60	
vor: 5'- CTGGGAGAGCACACCACAATGTCCTTGAGGGC-3' rück: 5'-GCCCTCAAGGACATTGTGGTTGTGCTCTCCCAG-3'	I73H	65	
vor: 5'- CTGCAGCTCACTGCCATGAGTCCCGCATCC- 3' rück: 5'- GGATGCGGGACTCATGGCAGTGAGCTGCAG- 3'	Y59H	65	
vor: 5'- CTGGGAGAGCACACCACCATGTCCTTGAGGGC-3' rück: 5'-GCCCTCAAGGACATGGTGGTTGTGCTCTCCCAG-3'	I73H/N74H	65	2% DMSO
vor: 5'- CTCTGGTACCACCACTGTGGAGGTTCCCTC-3' rück: 5'- GAGGGAACCTCCACAGTGGTGGTAGCCAGAG-3'	F41H	60	
vor: 5'-GAACTCTGGCCACGCCTTCTGTGGAGG-3' rück: 5'-5'-GAACCTCCACAGAAGGCGTGGCCAGAG-3'	H40A	60	
vor: 5'-GGTGTCCCTGCACTCTGGCTACC-3' rück: 5'-GTGGTAGCCAGAGTGCAGGGACAC-3'	N34H	53	
vor: 5'-GGAGAGCACAAATCCATGTCCTTGAGGGC-3' rück: 5'-GCCCTCAAGGACATGGATGTTGTGCTCTCC-3'	N74H	65	
vor: 5'-GGAGGCAAGAAATCCTGCCAG-3' rück: 5'-CTGGCAGGATTTCTGCCTCC-3'	D189K	60	

3.3. VEKTOREN/PLASMIDE

Zur ortsgerichteten Mutagenese von Trypsin wurde der *Escherichia coli* Vektor pST verwendet. Dieser ist mit einer Ampicillin Resistenz ausgestattet und enthält die Sequenz für anionisches Rattentrypsinogen II, welches als Fusion aus einem „ α -factor-leader“ und einem GAPDH/ADH Promotor vorliegt. Flankiert ist dieses Konstrukt mit jeweils einer Schnittstelle für die Restriktionsenzyme Bam HI und Sal I.

Die Trypsinvarianten wurden in dem *Saccharomyces cerevisiae* Expressionsvektor pYT exprimiert und auf Leucin und Uracil selektiert.

Beide Plasmide, sowohl pST als auch pYT, enthalten das Ampicillinresistenzgen als Selektionsmarkierung.

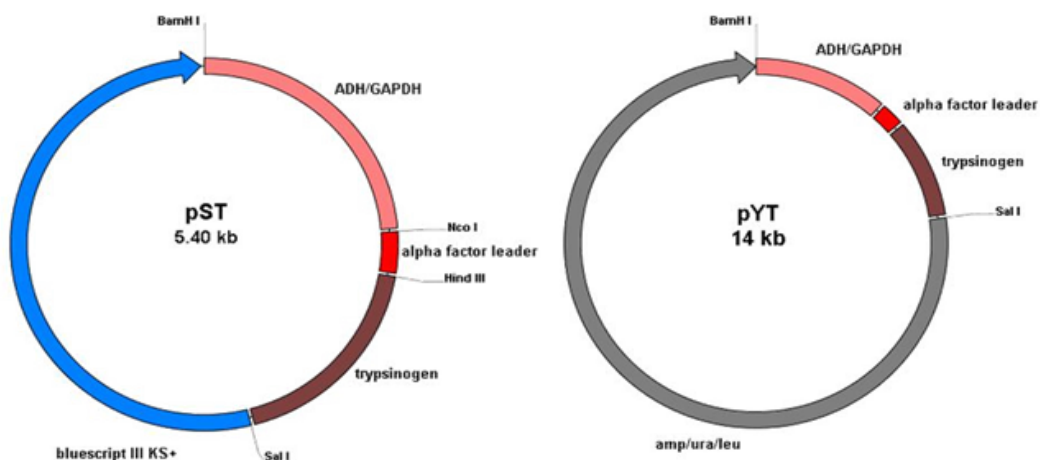


Abbildung 3. Vektorkartierungen der Vektoren pST und pYT.

3.4. BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME

Als Bakterienstamm zur Transformation und zur Ligation wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (*fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)*U169* *phoA* *glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)*M15* *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*) verwendet. Zur Proteinexpression diente *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* DLM 101 α [Mat a, leu 2-3,-112 his 2, 3-11,-15 can1, ura 3 Δ , pep4 Δ , [cir₀], DM 23]).

3.5. NÄHRMEDIEN

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden unterschiedliche Nährmedien verwendet (Tabelle 2). Die Expression der Trypsinvarianten erfolgte in einem Minimalmedium. Leucin und Uracil wurden nicht hinzugefügt.

Tabelle 2. Medienzusammensetzungen für YPD, SC und LB [108].

	SC – ura – leu	[g/l]
	Hefe Stickstoffbase	6,6
	0,37 g Adenin, 1 g HisxHCl, 1 g ArgxHCl, 1 g Met, 1,5 g Tyr, 1,5 g Ile, 1,5 g Lys x HCl, 2,5 g Phe, 5 g Asp, 7,5 g Val, 10 g Thr, 18,75 g Ser	1,3
- leu	Leucin [109]	0,036
- ura	Uracil [109]	0,024
	Glucose (Roth)	80
	Agar (AppliChem, Darmstadt)	20
	LB	[g/l]
	Bacto-Pepton (GIBCOBRL, Schottland)	10
	NaCl	10
	Hefeextrakt (SERVA, Heidelberg)	5
	Agar (AppliChem, Darmstadt)	20
	Antibiotikum: Ampicillin	0,1
	YPD	[g/l]
	Hefeextrakt (SERVA, Heidelberg)	5
	Bacto-Pepton (GIBCOBRL, Schottland)	10

3.6. GERÄTE

3.6.1. CHROMATOGRAPHIE

Als chromatographische Methoden zur Analyse von Reaktionsansätzen wurden die Dünnschichtchromatographie, HPLC (*high performance liquid chromatography*), UPLC (*ultra performance liquid chromatography*) sowie die „Flash-Chromatographie“ verwendet. Die UPLC-Analytik wurde mit einer Aquity™ Ultrapformance LC der Waters GmbH (Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Als Software diente MassLynx. Zur HPLC-Analytik wurde eine binäre Pumpe 1525 von waters mit einem 2485 Detektor von waters und einem 717plus autosampler von waters verwendet. Als Software diente breeze™.

Zur Perfusionschromatographie kam ein BioCad 700 mit entsprechender Software zum Einsatz. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um einen Anionenaustauscher.

3.6.2. MASSENSPEKTROMETRIE

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit einem LC-MS-System der Waters GmbH. Bei dem Massenspektrometer handelte es sich um ein micromass ZQ mit einem ESI (*electron spray ionisation*) Probenkopf.

3.6.3. NMR-SPEKTROSKOPIE

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Syntheseprodukte erfolgte mit einem Avance 400 NMR Spektrometer der Firma Bruker® Biospin (Rheinstetten, Deutschland).

3.6.4. UV-SPEKTROSKOPIE

Die UV-Spektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Jasco Photometer durchgeführt. Die ELISA Messung wurde mit einem Novostar™ von BMG Labtech®, Offenburg durchgeführt.

4. METHODEN

4.1. ANALYTISCHE METHODEN

4.1.1. CHROMATOGRAPHIE

Als Laufmittel für HPLC-, UPLC- und LC-MS-Analysen wurden Acetonitril-Wasser Gemische mit 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure verwendet.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄-Platten von Merck (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Als Laufmittel kamen in der Hauptsache Gemische aus Petrolether (Fraktion 40-60) und Essigsäureethylester oder Chloroform und Methanol zum Einsatz.

Für die Flash-Chromatographie wurde Si₆₀- Material verwendet. Als Laufmittel dienen in der Regel Gemische aus Petrolether (Fraktion 40-60) und Essigsäureethylester oder Chloroform und Methanol. Die Verwendung der Flash-Chromatographie erfolgte entweder „manuell“ oder automatisch mit Hilfe des Flash-Chromatographie-Systems CombiFlash[®] Companion der Firma ISCO (Teledyne Isco; Lincoln, Nebraska, USA). Das verwendete Säulenmaterial war auch hier Si₆₀.

Für die Perfusionschromatographie wurde ein Anionenaustauscher als stationäre Phase mit 1,5 M NaCl als Eluent verwendet.

4.1.1.1. Hydrophobe Interaktions Chromatographie (HIC)

Zur HIC-Analyse wurde eine TSK-Gel Butyl-NPR Säule (4,6 mm x 3,5cm) von TOSOH Bioscience GmbH, Griesheim verwendet. Als Puffer A wurde 1,5 M Ammoniumsulfat, 0,05 M HEPES Puffer, pH 7,5 verwendet. Elutionspuffer B bestand aus 0,05 M HEPES Puffer, pH 7,5. Elutionsbedingungen waren wie folgt: 0-2 min 100% Puffer A, 2-15 min 0 – 100% Puffer B bei 0,5 ml/min.

4.1.2. PROTEINANALYTIK

Proteine wurden nach Lämmli ^[110] mittels SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch voneinander getrennt. Hierzu wurden 15%-ige Gele verwendet. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau.

4.1.3. MASSENSPEKTROMETRIE

Massenspektrometrische Analysen wurden mit Hilfe eines LC gekoppelten Massenspektrometers (Micromass ZQ 2000) durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Massen wurde oberhalb von 2000 Da mit Hilfe einer MassLynx[™] software mittels MaxEnt[™] berechnet. Vor jeder Messung wurde das Gerät kalibriert. Der Fehler beträgt +/-1 Da.

4.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN

Alle molekularbiologischen Arbeiten bestehend aus Polymerasekettenreaktion, Restriktionsverdau der Plasmide bzw. Vektoren, Ligation, Transformation und Präparation der Vektoren wurden nach Standardprotokollen nach Maniatis et al. ^[111] durchgeführt.

Zur Expression in Hefe muss das Trypsinogenfragment in den Hefeexpressionsvektor pYT kloniert werden. Dazu wurde das aufgereinigte Plasmid (pST) mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Sal I verdaut.

Die DNS-Sequenzen der so erzeugten Trypsinvarianten wurden im pYT-Vektor mittels DNS Sequenzanalyse durch MWG (Martinsried, Deutschland) verifiziert.

4.3. PROTEINBIOCHEMISCHE ARBEITEN

4.3.1. EXPRESSION UND REINIGUNG DER TRYPSINVARIANTEN

Das Plasmid wurde nach gängigen Methoden in *S. cerevisiae* transformiert. Ausgestrichen wurden die Hefen zunächst auf Sc-ura Platten (vier Tage, 30 °C). Einige der gewachsenen Kolonien wurden dann auf Sc-leu Platten übertragen und für zwei Tage ebenfalls bei 30°C angezogen.

Die auf den Sc-leu Platten gewachsenen Hefekolonien wurden dann in Sc-leu Flüssigmedium für weitere drei Tage bei 30 °C inkubiert, um dann in die Hauptkultur überimpft zu werden.

Die Hauptkultur fand in nicht selektivem YPD Medium statt. Induziert wurde die Expression des jeweiligen Trypsinogens durch die Absenkung des Glucosegehalts von 8% im Sc-leu Medium auf 1,2% im YPD Medium.

Da das Trypsinogen aufgrund der α -factor leader Sequenz in dem pYT-Vektor ins Medium abgegeben wird, wurden die zellulären Bestandteile abzentrifugiert (SORVALL RC 5B PLUS, 10 min bei 1704xg) und der Überstand aufgearbeitet.

Der pH-Wert wurde mit einer 1 M HCl-Lösung auf pH 4 eingestellt. Die dabei ausgefallenen Proteine sowie ungelöste restliche Zelltrümmer wurden durch erneute Zentrifugation (SORVALL RC 5B PLUS, 15 min bei 15337xg) entfernt.

Eine mit 2 mM Na-Acetat/100 mM Essigsäure äquilibrierte Kationenaustauschsäule (Toyopearl 650 M (SUPELCO), pH 4,5) wurde mit der Proteinlösung beladen. Die Elution erfolgte mit 0,2 M Tris-HCl-Puffer bei pH 8. Die Trypsinogen enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) identifiziert, vereinigt und mit Centriprep-10 Konzentratoren (AMICON) auf ein Volumen von etwa 20 ml eingengt. Die Trypsinogenlösung wurde mit 1 M NaOH auf pH 6 eingestellt und mit 0,4 U Enterokinase (EK 4, New England Biolabs) aktiviert. Die Aktivierung wurde mittels SDS-PAGE verfolgt und war jeweils nach drei bis vier Tagen abgeschlossen.

Nach der Aktivierung des Trypsinogens wurden verbliebenes Trypsinogen, Propeptid und aktiviertes Trypsin mit einer Anionenaustauschsäule per Perfusionschromatographie (BioCad 700) voneinander getrennt. Eluiert wurde mit einem 1,5 M NaCl Gradienten von 0-30%. Die gesammelten

Trypsinfraktionen wurden gegen 1 mM HCl bei 4°C dialysiert, aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert.

4.3.2. CHARAKTERISIERUNG DER TRYPSINVARIANTEN

4.3.2.1. Hydrolysestudien

Die hydrolysekinetischen Untersuchungen wurden mit den dargestellten Trypsinvarianten K60E/D189K/F41H/N74H, K60E/D189K/Y39H/H40A, K60E/D189K/F41H/Y59H, K60E/D189K/N34H, K60E/D189K/Y39H/N74H, K60E/D189K/Y39H/I73H, K60E/D189K/I73H/N74H und K60E/D189K/Y59H/Y39H durchgeführt. Für Hydrolysestudien genutzt wurden die Peptide Bz-YRAAG-OH, Bz-YRHAAG-OH, Bz-AAYRAHAAG-OH jeweils in Gegenwart von Zink oder EDTA. Der Reaktionsansatz bestand aus 1 mM Peptid, 10 µM Trypsinvariante, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 8. Die Hydrolysen der Modellpeptide wurden mit Hilfe der UPLC analysiert. Dazu wurden nach bestimmten Zeitintervallen den Reaktionsmischungen Aliquote entnommen und mit 50% (v/v) Essigsäure versetzt. Die Zeitintervalle wurden den Umsatzgeschwindigkeiten der jeweiligen zu testenden Trypsinvarianten angepasst, so dass die Hydrolysegeschwindigkeiten im linearen Bereich bestimmt werden konnten. Die Ergebnisse stellen das Resultat aus mindestens zwei unabhängigen Messreihen dar. Die Resultate lagen in keinem Fall mehr als 5% auseinander.

4.3.2.2. Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und k_{cat}

Die enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} wurden für die Hydrolyse der Peptide Bz-AAYRAAHAG-OH, Bz-AAYRAHAAG-OH und Bz-AAYRHAAAG-OH durch die Trypsinase II bestimmt. Die Hydrolysereaktionen wurden in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 7,8 durchgeführt. Zur Ermittlung der Parameter wurden die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten (siehe 4.3.2.1.) für Peptidkonzentrationen von 0,1 mM - 8 mM bestimmt und nach *Lineweaver-Burk* ^[112] ausgewertet. Hierzu wurden reziproke Werte aus der initialen Hydrolysegeschwindigkeit auf der Ordinate gegen die reziproke Substratkonzentration auf der Abszisse aufgetragen. $-1/K_M$ ergibt sich aus dem Abszissenschnittpunkt; $1/V_{max}$ ergibt sich aus dem Ordinatenschnittpunkt. K_{cat} wird aus dem Quotient aus V_{max} und der verwendeten Enzymkonzentration berechnet. Die Ergebnisse der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten wurden durch zwei voneinander unabhängige Messungen bestätigt.

4.3.2.3. Acyltransfer- und Transamidierungsreaktionen

Acyltransferreaktionen wurden mit Bz-Gly-OGp, Boc-Ala-OGp und Pentinsäure-OGp als Acyldonoren durchgeführt. Als Acylakzeptoren wurden AHAAG, AAHAG, RHAK(5,6CF), RAHAK(5,6CF), RAAHK(5,6CF) und RHAAK(5,6CF) verwendet. Die finalen Konzentrationen betragen 0,1-4 mM Ester, 0,1-4 mM Acylakzeptor (Nukleophil) und 10-20 µM Enzymvariante. Als Puffer diente 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 7.

Transamidierungen wurden mit 0,1-4 mM mM Acyldonor und 0,1-4 mM mM Acylakzeptor (Nukleophil) durchgeführt. Die Trypsinvariante wurde in einer Konzentration von 10-20 µM eingesetzt. Als Puffer wurde 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 7,8 verwendet.

4.3.2.4. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von hCyp18

Die enzymatische Aktivität von hCyp18 vor und nach der Modifizierungsreaktion wurde mit Hilfe der durch Chymotrypsin katalysierten Hydrolyse von Suc-AFPF-pNA bestimmt ^[113]. Hierzu wurden 0,2 mg/ml Chymotrypsin in 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8 gelöst. Die PPIase hCyp18 wurde in Konzentrationen von 1 nM – 4 nM hinzugegeben. Das Substrat Suc-AFPF-pNA wurde in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt und der Reaktionsmischung zum Schluss hinzugefügt. Die Messtemperatur betrug 10 °C. Die resultierende Zeit-Umsatz-Kurve wurde nach einer Reaktion erster Ordnung angepasst, welche dem Quotienten k_{cat}/K_M entspricht. Die Ergebnisse wurden durch drei voneinander unabhängige Messungen bestätigt.

4.3.3. ELISA

4.3.3.1. F_{ab}-Anti-TNF α

In einem ersten Schritt wurden Mikrotiterplatten mit einer Lösung aus TNF α ^[114] (2,3 μ g/ml) in PBS⁵ (pH 7,3) über Nacht bei 10 °C adsorptiv immobilisiert. Für jedes Reaktionsgefäß wurden 50 μ l dieser Lösung verwendet. Nach erfolgter Immobilisierung wurde jedes Reaktionsgefäß bis zu drei Mal mit PBST⁶ gewaschen. Noch vorhandene Bindungsstellen in den Reaktionsgefäßen wurden mit BSA⁷ (3% w/v; „Blockierlösung“) abgesättigt. Die Mikrotitergefäße wurden 2h bei Raumtemperatur mit der Blockierlösung inkubiert und anschließend drei Mal mit PBST gewaschen. Nach Inkubation von 50 μ l einer Stammlösung von F_{ab}-Anti-TNF α und einer sich anschließenden einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden unspezifisch gebundene Anteile abermals mit PBST (drei Mal) entfernt. Daraufhin wurden 50 μ l eines HRP⁸-konjugierten Anti-IgG (Anti-Human IgG (F_{ab} specific)-Peroxidase antibody produced in goat; 1:20000) Antikörpers in die Reaktionsgefäße gegeben und abermals für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifisch gebundenes HRP-Anti-IgG wurde mit PBST und PBS entfernt. 50 μ l einer TMB⁹ ^[115] wurde gefolgt von 50 μ l einer 0,2 M Schwefelsäurelösung in Wasser in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Die Messung des Farbstoffs erfolgte bei 450 nm in einem Plattenleser.

Bestimmung der Bindungskonstante K_D

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität des F_{ab}-Fragmentes F_{ab}-Anti-TNF α gegenüber dem entsprechenden Antigen TNF α wurde der Logarithmus der jeweilig verwendeten Konzentration des F_{ab}-Fragmentes (freies Fab; ermittelt aus der Differenz aus eingesetztem F_{ab} und nicht gebundenem F_{ab}) auf der Ordinate und die Konzentration an gebundenem Fab (welcher der Farbstoffmessung entspricht) auf der Abszisse aufgetragen. Der Wendepunkt der daraus resultierenden sigmoidalen Kurve entspricht hierbei dem Logarithmus der Bindungskonstante K_D .

⁵ Phosphate Buffered Saline („phosphatgepufferte Salzlösung“); 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 12 mM Phosphat; pH 7,4

⁶ Phosphate Buffered Saline TWEEN® ; 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 12 mM Phosphat; 0,1% TWEEN® 20 (v/v); pH 7,4

⁷ Bovines Serumalbumin

⁸ Horseradish peroxidase („Meerrettich Peroxidase“)

⁹ 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin

4.3.3.2. F_{ab}-Anti-Her2

Als Antigen des Anti-Her2 F_{ab}-Fragments wurde das mimetische Peptid QLGPYELWELSH wie bei Jiang et al. Verwendet. QLGPYELWELSH wurde N-terminal mit einer kurzen PEG Einheit modifiziert und zu Zwecken der Immobilisierung ebenfalls am N-Terminus mit Biotin versehen. Bio-PEG-QLGPYELWELSH wurde auf mit Streptavidin modifizierten Mikrotiterplatten immobilisiert. Die ELISA Prozedur und Auswerten erfolgte wie bereits in beschrieben.

4.3.4. ENZYMATISCHE DERIVATISIERUNGEN VON PROTEINEN

4.3.4.1. Acyltransfer- und Transamidierungsreaktionen

Acyltransferreaktionen zur N-terminalen Derivatisierung von Proteinen wurden mit 4-Pentinsäure-OGp als Acyldonor und den Proteinen YRAH-Cyclophilin18-YRH-OH sowie YRH-Pin1-OH als Acylakzeptoren durchgeführt. Es wurden 1 mM Acyldonor und 100 – 200 µM Acylakzeptor verwendet. Als Puffer kam 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 7,8 zum Einsatz.

Transamidierungsreaktionen zur C-terminalen Derivatisierung von Proteinen wurden mit dem F_{ab}-Fragment des Antikörpers Anti-Her2 als Acyldonor und dem modifizierten Peptid RHAAC(Tetrazin)-OH als Acylakzeptor durchgeführt. Der Acyldonor F_{ab} Anti-Her2 wurde in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt, die finale Acylakzeptorkonzentration betrug jeweils 1 mM. Als Puffer wurde 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 7,8 verwendet.

4.3.5. EXPRESSION DER ZU MODIFIZIERENDEN PROTEINE

E. coli Strep-YRH-Parvulin10-OH, Strep-YRH-CyP18-OH, Strep-YRAH-CyP18-YRH-OH, Strep-YRH-*h*Pin1-OH, F_{ab}-Anti-Her2-YRH-Strep und F_{ab}-anti-TNFα-YRH-Strep wurden freundlicherweise in den benötigten Mengen von Dr. Sandra Liebscher (AG Prof. Bordusa, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

4.4. CHEMISCHE ARBEITEN

4.4.1. PEPTIDSYNTHESE

Die Synthese der Peptide erfolgte nach der orthogonalen Fmoc/*t*-Butyl Strategie. Als Harz wurde das 2-Chlortrityl Harz verwendet. Die Peptidsynthesen erfolgten in Polypropylen Reaktoren. Die Carboxykomponente wurde jeweils mit TBTU und DIPEA in DMF aktiviert. Die Abspaltung von Fmoc erfolgte mit 20% (v/v) Piperidin in DMF.

Im Falle der an der Lysinseitenkette modifizierten Peptide wurde Fmoc-Lys(Dde) verwendet. Die Abspaltung der Dde-Seitenkettenschutzgruppe erfolgte mittels 2% Hydrazin in DMF^[116] oder Hydroxylamin^[117] am Harz und anschließender Kupplung von Carboxyfluorescein.

Benzoylierungen der *N*-Termini entsprechender Peptide wurden mit durch TBTU¹⁰ aktivierter Benzoesäure direkt am Harz nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durchgeführt.

Die Darstellung aller weiteren, modifizierten Peptide wird unter 4.4.4. beschrieben.

Die Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte mit 95% TFA (v/v), 2,5% TIS (v/v), 2,5% Wasser (v/v). Nach Verdampfen der TFA wurde das Peptid mit Ether gefällt. Die Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC in einem Acetonitril-Wasser Gradienten. Acetonitril bzw. Wasser enthielten jeweils 0,1% TFA (v/v).

4.4.1.1. Verwendete Peptide

Einige der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Peptide (Tabelle 3) wurden der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. F. Bordusa entnommen. Das Peptid RHAK(6CF)-OH wurde freundlicherweise von Frau Dr. S. Liebscher zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete bzw. synthetisierte Peptide und Aminosäurederivate

Peptid	Herkunft
RHAAC-OH	eigene Synthese
Bz-AA YRAAG-OH	eigene Synthese
Bz-AA YRHAAG-OH	eigene Synthese
Bz-AA YRHAAAG-OH	eigene Synthese
Bz-AA YRAHAAG-OH	eigene Synthese
Bz-AA YRAAHAG	eigene Synthese
AAHAG-OH	Stammsammlung AG Prof. Bordusa
AHAAG-OH	Stammsammlung AG Prof. Bordusa
RHAK-OH	Dr. Sandra Liebscher
RAHAK-NH ₂	eigene Synthese
RAHAK-OH	eigene Synthese
RAAHK-OH	eigene Synthese
Bz-G-OGp	Stammsammlung AG Prof. Bordusa
Boc-A-OGp	Stammsammlung AG Prof. Bordusa
Bio-PEG-QLGPYELWELSH	Von der AG Prof. Bordusa zur Verfügung gestellt

4.4.2. KLINK-REAKTION

4.4.2.1. Klick-Reaktion in Lösung

Die Klick-Reaktionen zwischen Aziden (2 Äq.) und terminalen Alkinen (1 Äq.) am Protein und Zuge einer Modellreaktion wurden im wässrigen, gepufferten Medium durchgeführt. Dabei wurde CuSO₄ (0,5 Äq.) als Cu(I) Quelle verwendet und mit Hilfe von Ascorbinsäure *in situ* (25 Äq.) reduziert. Als Ligand kamen entweder TBTA (5 Äq.) oder THPTA (5 Äq.) zum Einsatz. Als Additiv wurde Aminoguanidin verwendet (25 Äq.)^[105]. Die Reaktionen erfolgten in 0,1 M entgastem HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 8. Die Reaktionszeit betrug in Abhängigkeit von den verwendeten Substraten bis zu zwei Stunden.

¹⁰ O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat

4.4.2.2. Klick-Reaktion mit Cu(I)-NTA am polymeren Träger

1 ml Ni-NTA Material wurde mit 10 ml 0,1 M EDTA-Lösung gewaschen. Der EDTA-Ni Komplex wurde durch Waschen mit 10 ml Wasser entfernt. Das Säulenmaterial wurde mit 10 ml einer 2 mM CuSO₄, 10 mM Ascorbinsäure und 10 mM Aminoguanidin gewaschen. Um zu gewährleisten, dass möglichst wenig Cu(II) in Lösung vorhanden ist, wurde das Säulenmaterial nochmals mit 10 ml einer 10 mM Na-Ascorbat-Lösung und 10 ml einer 10 mM Aminoguanidin-Lösung gewaschen. Die Klick-Reaktion wurde in 0,1 M entgastem HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 8 durchgeführt. Dazu wurde das in Puffer (0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 8) gelöste alkinmodifizierte Protein (1 q.) zu dem Säulenmaterial (40 µl) gegeben und die Reaktion anschließend mit 2 q. der in DMF gelösten Azidkomponente gestartet. Die Reaktionszeit betrug in Abhängigkeit von den verwendeten Substraten bis zu 2 h. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurde das Säulenmaterial bei 5 krpm abzentrifugiert. Der berstand wurde analysiert.

4.4.3. DIELS-ALDER CYCLOADDITION: NORMAL/INVERS

Diels-Alder Reaktionen wurden in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂/EDTA; pH 7 durchgeführt. Für die Diels-Alder Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf wurden Tetrazinderivate als Dienkomponenten und Norbornen- bzw. Styrenderivate als Dienophile in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zueinander verwendet. Diese waren: (Dien:Dienophil) 2:1, 1:2, 1:1. Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte in DMF. Die Ausbeutebestimmung erfolgte mit Hilfe des Standards Hippursäure in zwei voneinander unabhängigen Messungen. Der Fehler war geringer als 3%.

4.4.4. SYNTHESSEN

Synthese von 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure

12,5 mmol 4-Cyanobenzoesäure, 25 mmol Formamidinacetat und 12,5 mmol Schwefel wurden in einem Mörser vermischt und in einen 100 ml Rundkolben gegeben. 133 mmol Hydrazinhydrat wurden langsam über einen Tropftrichter zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h mit einem Magnetrührer gerührt. Dem entstandenen orangefarbenen Reaktionsgemisch wurden unter Eiskühlung 15 ml Essigsäure und 3 g NaNO₂ zugegeben. Die Oxidation ging mit der Entwicklung nitroser Gase einher. Das rote Produktgemisch präzipitierte und wurde mit Hilfe einer Glasfritte abfiltriert. Das Präzipitat wurde in wenigen Millilitern DMSO aufgenommen und in einem Chloroform-Methanol Gradienten unter Einsatz von Kieselgel 60 gereinigt. Die Kristallisation erfolgte aus einem Methanol-Wasser Gemisch.

Synthese von Methoxy-PEG-Tetrazinylbenzoat

0.05 mmol 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure, 0.05 mmol Diisopropylcarbodiimid und 0.005 mmol 4-(Dimethylamino)pyridine wurden in DMF zusammen mit Methoxy-PEG_{10k}-NH₂ gelöst. Nach einer Reaktionsdauer von zwei Stunden wurde das entstandene Produkt mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie mittels einer PD10-Säule (GE Healthcare, Solingen) aufgereinigt. Die farbigen Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert.

Synthese von N-(Prop-2-yn-1-yl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)-benzamid

0,15 mmol 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure, 0,15 mmol Isobutylchloroformiat und 0,3 mmol Triethylamin wurden bei -20°C in DMF gelöst und für eine halbe Stunde gerührt. 1,5 mmol Propargylamin wurden zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 18 h. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte nach der Entfernung von DMF im Vakuum bei 55 °C mittels präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril (0,1% TFA v/v) Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase (RP) Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von Tetrazinyl-PEGazid

0,15 mmol 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure, 0,15 mmol Isobutylchloroformiat und 0,3 mmol Triethylamin wurden bei -20°C in DMF gelöst und für eine halbe Stunde gerührt. 1,5 mmol 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin wurden zugegeben und für weitere 18 h gerührt. Nach Entfernung von DMF im Vakuum bei 55 °C erfolgte die Aufreinigung per präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril (0,1% TFA v/v) Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von Tetrazinylmaleinimid

0,05 mmol 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure, 0,1 mmol Triethylamin und 0,05 Isobutylchloroformiat wurden bei -20°C in DMF für 30 Minuten gerührt. 0,05 mmol 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrol-2,5-dion*TFA wurden zugegeben und für weitere 18 h gerührt. Nach Entfernung von DMF im Vakuum bei 55 °C erfolgte die Aufreinigung per präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril (0,1% TFA v/v) Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von RHAAC(Tetrazinylmaleinimid)-OH, RHAC(Tetrazinylmaleinimid)-OH

0,009 mmol H-RHAAC-OH bzw. H-RHAC-OH und 0,003 mmol Natrium-Ascorbat wurden in 5 ml 20 mM HEPES-Puffer; pH 8 gelöst. 0,006 mmol N-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzamid wurden zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 12 h. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte per präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol*Acetat

12,5 mmol Ethyl-4-Hydroxybenzimidat*HCl und 37,5 mmol Formamidinacetat wurden in einem Mörser vermischt und in einen 100 ml Rundkolben gegeben. 162,5 mmol Hydrazinhydrat wurden langsam über einen Tropftrichter zugegeben. Die Reaktion verlief leicht exotherm und hatte eine orangefarbene, klare Lösung zur Folge. Die Lösung wurde über einen Zeitraum von fünf Stunden mit einem Magnetrührer gerührt. Nach Zugabe von 15 ml Essigsäure und 3 g NaNO₂ entwickelten sich nitrose Gase. Das Lösungsmittel wurde verdampft. Das rote Produktgemisch wurde per Flash-

Chromatographie mit Dichlormethan als Laufmittel isokratisch gereinigt. Als stationäre Phase wurde Kieselgel Si₆₀ verwendet.

Synthese von 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenylchlormethansulfonat

0,15 mmol 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol*Acetat und 0,225 mmol Chlormethansulfonylchlorid wurden in Chloroform gelöst. Nach Zugabe von 20 ml Wasser und einer Spatelspitze Tetrabutylammoniumbromid sowie 0,3 mmol NaOH wurde die Reaktion durch starkes Rühren mit einem Magnetprüher gestartet. Das im Laufe von wenigen Stunden entstandene Syntheseprodukt war durch eine Farbänderung des Tetrazinderivats erkennbar und wurde durch Abtrennen der wässrigen Phase erhalten. Die verbliebene Chloroformphase wurde bei 40 °C im Vakuum eingengt und mittels Flash-Chromatographie unter Einsatz von Dichlormethan als Laufmittel und Kieselgel Si₆₀ als stationäre Phase aufgereinigt.

Synthese von 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenylazidomethansulfonat (Dansyltetrazin)

0,15 mmol 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenylchlormethansulfonat und 0,3 mmol Natriumazid wurden in Chloroform gelöst. Nach Zugabe von Wasser und einer Spatelspitze Tetrabutylammoniumbromid wurde die Reaktion durch starkes Rühren mit einem Magnetprüher gestartet. Das im Laufe von wenigen Stunden entstandene Syntheseprodukt war durch eine Farbänderung des Tetrazinderivats erkennbar und wurde durch Abtrennen der wässrigen Phase erhalten. Die verbliebene Chloroformphase wurde bei 40 °C im Vakuum verdampft und mittels Flash-Chromatographie unter Einsatz von Dichlormethan als Laufmittel und Kieselgel Si₆₀ als stationäre Phase aufgereinigt.

Synthese von 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl 5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonat

0,15 mmol 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol wurden mit 0,3 mmol Dansylchlorid in Chloroform gelöst. Nach der Zugabe von Wasser, einer Spatelspitze Tetrabutylammoniumbromid und 0,3 mmol NaOH wurde der Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 12 h stark gerührt. Nach Abtrennung der Chloroformphase und Verdampfen des Lösungsmittels bei 40 °C im Vakuum wurde das Reaktionsprodukt mit Hilfe der Flash-Chromatographie gereinigt. Als Laufmittel wurde Petrolether: Essigsäureethylester (8:2) verwendet. Als stationäre Phase diente Kieselgel Si₆₀.

Synthese von 2-Azidoethanamin*TFA

0,06 mol Bromethanamin*HBr wurden in DMF mit 0,009 mol Triethylamin gelöst und anschließend mit 0,12 mol Di-*tert*-butylcarbonat versetzt. Die Reaktionsdauer betrug 12 h. Die Aufarbeitung des Intermediats *Tert*-butyl (2-bromoethyl)carbamat erfolgte nach Verdampfen des DMF im Vakuum durch Lösen des Reaktionsansatzes in Essigsäureethylester und Ausschütteln mit 5%iger KHSO₄ (m/v) Lösung. Die organische Phase wurde nochmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und anschließend verdampft. Das entstandene *tert*-butyl (2-bromoethyl)carbamat wurde in DMF gelöst und mit 0,12 mol Natriumazid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h auf 80 °C erhitzt. Die Aufarbeitung des Produkts erfolgte durch Lösen des Reaktionsansatzes in Essigsäureethylester und Ausschütteln mit gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel verdampft. Es verblieb ein öliger Rückstand. Durch Zugabe von Trifluoressigsäure (50% v/v) in DCM wurde 2-Azidoethanamin freigesetzt.

Synthese von N-(2-Azidoethyl)-5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamid***(Azidoethyldansylchlorid)***

9,8 mmol 5-Dimethylamino-1-naphthalensulfonylchlorid (Dansylchlorid) wurden gemeinsam mit 19,6 mmol Diisopropylethylamin und 9,8 mmol 2-Azidoethanamin*TFA in DMF gelöst und gerührt. Die Reaktionsdauer betrug 12 h. Die Aufarbeitung des Produktes erfolgte durch Lösen des Reaktionsansatzes in Essigsäureethylester und Ausschütteln mit 5%iger KHSO₄-Lösung (m/v). Die organische Phase wurde nochmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde verdampft. Der verbliebene ölige Rückstand wurde per Flash-Chromatographie unter Einsatz von Petrolether:Essigsäureethylester (7:3) als Laufmittel und Kieselgel Si₆₀ aufgereinigt.

Synthese von 4-[2-Methoxyethenyl]benzoesäure

6 mmol (Methoxymethyl)(triphenyl)phosphoniumchlorid wurden in Diethylether gelöst und mit 6 mmol Butyllithium versetzt. Die rot gefärbte Lösung wurde in einem mittels Trockeneis gekühlten Isopropanolbad auf -70 °C gekühlt. In die temperierte Lösung wurden 6 mmol 4-Formylbenzoesäure in Ether/DMF (1:1) getropft. Nach erfolgter Entfärbung der Lösung wurden weitere 18 mmol n-Butyllithium zugetropft. Die Aufarbeitung des Produktes erfolgte durch Zugabe von 10 ml Eisessig und Ausschütteln der wässrigen Phase mit Diethylether. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde verdampft. Die Produktaufreinigung erfolgte über eine Flash-Chromatographie. Eluent war ein Petrolether:Aceton Gemisch (8:2). Als stationäre Phase wurde Kieselgel Si₆₀ verwendet.

Synthese von 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-prop-2-yn-1-ylharnstoff

1 mmol Methoxyethenylbenzoesäure, 1 mmol Isobutylchloroformiat und 1,5 mmol Triethylamin wurden in Aceton gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min unter Eiskühlung gerührt. 2 mmol Natriumazid wurden in 5 ml Wasser gelöst und langsam zu dem Reaktionsgemisch zugetropft. Die Bildung des Säureazids dauerte ein bis zwei Stunden. Die Aufarbeitung des Produktes erfolgte durch Zugabe von Wasser und mehrmaliges Ausschütteln der wässrigen Phase mit Toluol. Die organischen Phasen wurden gesammelt, zunächst mit Na₂SO₄ vorgetrocknet und final noch einmal mit einigen Gramm Phosphorpentoxid unter Eiskühlung nachgetrocknet. Phosphorpentoxid wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde in einen Tropftrichter gegeben und langsam in einen Kolben getropft, der sich in siedendem Wasser befand. Nach Beendigung des Zutropfens wurde die Toluollösung noch eine weitere Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Zu dem verbliebenen Toluol wurden 1,5 mmol Propargylamin gegeben. Die Aufreinigung des Produktes nach einer Reaktionszeit von 18 h erfolgte mit Hilfe der Flash-Chromatographie. Als Laufmittel wurde ein Petrolether: Aceton Gemisch (7:3) verwendet. Als stationäre Phase diente Kieselgel Si₆₀.

Synthese von N-(2-Azidoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid

0,4 mmol Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carbonsäure wurden zusammen mit 0,4 mmol Isobutylchloroformiat und 0,8 mmol Triethylamin bei -20° in THF gelöst. Nach ca. 30 Minuten

Reaktionszeit wurden 0,4 mmol 2-Azidoethanamin*TFA zugegeben. Die Aufarbeitung des Produktes erfolgte durch Waschen mit 5% KHSO₄-Lösung (m/v). Die Aufreinigung erfolgte per präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von H-RHAAPra(Norb)-OH

0,07 mmol H-RHAAPra-OH wurden zusammen mit 0,07 mmol N-(2-Azidoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid, 0,035 mmol CuSO₄ und 0,14 mmol Natriumascorbat in 20 mM HEPES; pH 8 gelöst. Die Reaktionszeit betrug 16 h. Die Aufreinigung des Peptidproduktes erfolgte per präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von N-(2-Aminoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid

0,9 mmol Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carbonsäure wurden zusammen mit 0,9 mmol Diisopropylethylamin und Isobutylchloroformiat in DMF bei -20 °C gelöst. Nach 30 Minuten Rühren wurden 1,35 mmol *tert*-butyl (2-Aminoethyl)carbammat zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 12 h bei Raumtemperatur. Die Boc-Schutzgruppe wurde mit 50% Trifluoressigsäure (v/v) in DCM abgespalten. Die Produktaufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von Norbornenyl-NBD

0,03 mmol N-(2-Aminoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid, 0,03 mmol 4-Chlor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol und 0,06 mmol Triethylamin wurden in DMF gelöst und gerührt. Die Reaktionsdauer betrug 1 h. Die Aufarbeitung des Produktes erfolgte durch Zugabe von Essigsäureethylester und Ausschütteln mit einer 5%-igen KHSO₄-Lösung (m/v). Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum bei 40 °C verdampft. Der verbliebene, ölige Rückstand wurde unter Zuhilfenahme der präparativen HPLC und unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min aufgereinigt. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid (Norb-Maleinimid)

0,022 mmol Exo-bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carbonsäure (exo Norbornen-Carbonsäure) wurde zusammen mit 0,044 mmol Diisopropylethylamin (DIPEA) und 0,025 mmol Diisobutylchloroformat in DMF bei -20 °C gelöst. Nach 30 Minuten wurden 0,044 mmol 1-(-Aminoethyl)-1H-Pyrrol-2,5-dione*TFA zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden fortgeführt. DMF wurde unter Vakuum entfernt. Norb-Maleinimid wurde präparativ in einem Acetonitril/Wasser Gradienten (0,1% (v/v) TFA) mittels HPLC gereinigt.

Synthese von Norb-DM1

0,002 mmol Norb-Maleinimid wurden zusammen mit 0,0014 mmol DM1 in DMF gelöst. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und mittel präparativer HPLC in einem Acetonitril/Wasser Gradienten (0,1% (v/v) TFA) gereinigt.

Synthese von 4-Carbamimidamidophenylpentinoat (Pentinsäure-OGp)

0,01 mmol 4-Pentinsäure wurden mit 0,01 mmol Isobutylchloroformiat bei -20 °C in DMF gelöst und mit 0,03 mmol Triethylamin versetzt. Nach 20 min wurden 0,02 mmol OGp(Boc,Boc)*Tosyl zugegeben. Die Reaktionsdauer betrug eine Stunde. Die Aufarbeitung des Produktes erfolgte durch Zugabe von Essigsäureethylester und Ausschütteln mit einer 5 %igen KHSO₄-Lösung (m/v). Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck). Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erfolgte mit 50 % TFA (v/v) in DCM. Anschließend wurde das TFA-DCM Gemisch verdampft. Das Produkt wurde in Ether gefällt.

Synthese von N-(2-Azidoethyl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid

0,15 mmol 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure, 0,15 mmol Isobutylchloroformiat und 0,3 mmol Triethylamin wurden bei -20°C in DMF gelöst und für eine halbe Stunde bei dieser Temperatur gerührt. 0,15 mmol Azidoethylamin*TFA wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 18 h gerührt. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte per präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von 4-[2-Methoxyethenyl]-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamid

0,5 mmol 4-[2-Methoxyethenyl]benzoesäure, 0,5 mmol Isobutylchloroformiat und 1 mmol Triethylamin wurden bei -20°C in DMF gelöst und für eine halbe Stunde gerührt. 0,75 mmol Propargylamin wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Nach Verdampfen des DMF im Vakuum bei 55 °C wurde das Reaktionsprodukt per präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min aufgereinigt. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von Norbornenyl-AHS

1 mmol 6-[(Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl)carbonsäure, 1 mmol Isobutylchloroformiat und 2 mmol Triethylamin wurden bei -20°C in DMF gelöst und für eine halbe Stunde gerührt. 2 mmol 6-Aminohexansäure und 2 mmol Triethylamin wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Nach Verdampfen des DMF im Vakuum bei 55 °C wurde das Reaktionsprodukt mit KHSO₄ und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde bei 40 °C im Vakuum verdampft.

Synthese von Norbornenyl-OGp

0,5 mmol 6-[(Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylcarbonyl)amino]hexansäure, 0,5 mmol Isobutylchloroformiat und 1 mmol Triethylamin wurden bei -20 °C in DMF gelöst und für eine halbe Stunde gerührt. 1 mmol OGp(Boc,Boc) und 1 mmol Triethylamin wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Nach Verdampfen des DMF im Vakuum bei 55 °C wurde das Reaktionsgemisch mit KHSO₄ und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde im Vakuum bei 40 °C verdampft. Zur Entfernung der Boc-Schutzgruppen wurde das verbliebene Öl in 95% TFA (v/v) und 2,5% Wasser (v/v) und 2,5% TIS (v/v) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdampfen der flüchtigen Komponenten im Vakuum bei 40 °C wurde das verbliebene Öl per präparativer HPLC unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril Gradienten bei 220 nm und einer Flußrate von 9 ml/min aufgereinigt. Hierzu wurde eine reverse Phase Säule verwendet (C8, Merck).

Synthese von Norb-CF

0.15 mmol *N*-(2-Aminoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamide wurden zusammen mit 0.2 mmol Diisopropylamin und 0.1 mmol 5,6-Carboxy-fluorescein-*N*-succinimidylester in DMF bei Raumtemperatur gelöst. Nach 60 Minuten wurde das Lösungsmittel DMF unter Vakuum bei 40 °C im Wasserbad entfernt. Das Produkt wurde mittels reverser Phase HPLC in einem Acetonitril/Wasser Gradienten (0.1% v/v TFA) gereinigt.

Synthese von [Bicyclo[2.2.1]Hept-5-en-2-ylcarbonyl)amino]methoxy-PEG_{10k} (Norb-PEG)

0.05 mmol Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carbonsäure wurde zusammen mit 0.05 mmol Diisopropylamin und 0.1 mmol Isobutylchloroformate in DMF bei -20 °C gelöst. Nach 30 Minuten wurde 0.05 mmol MeO-PEG_{10k}-NH₂ in Wasser zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden unter ständigem Rühren fortgeführt. Das verbliebene Lösungsmittel DMF wurde unter Vakuum bei 40 °C entfernt, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Das Reaktionsprodukt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Synthese von Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin^[105] (THPTA)

0,01 mol 3-Azido-1-propanol wurden zu einer Lösung von 0,0025 mol Tripropargylamin in THF unter einer Stickstoffatmosphäre gegeben. Hierzu wurden 0,05 mmol Kupfer(I)acetat gegeben. Nach Erhitzen der Mischung für 12 Stunden wurde das Lösungsmittel THF im Vakuum verdampft. Der verbliebene ölige Rückstand wurde mittels präparativer HPLC in einem Wasser/Acetonitril (0,1% TFA v/v) Gradienten über eine reverse Phase Säule (C8) gereinigt.

5. ERGEBNISSE

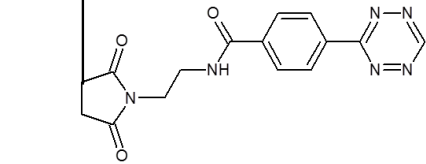
5.1. CHEMISCHE SYNTHESSEN

Bei der chemischen Synthese soll zwischen der Darstellung der Substrate für die jeweilige Trypsinvariante und den chemisch hergestellten Molekülen unterschieden werden, die der nachfolgenden Modifikation der Trypsinsubstrate dienen; im Folgenden als Reaktand bezeichnet.

5.1.1. SUBSTRATSYNTHESE

Die Peptide für die Trypsinvarianten zur C-terminalen Modifizierung von Peptiden und Proteinen wurden nach Standardmethoden mit hohen Ausbeuten synthetisiert (siehe Tab.). Darüber hinaus wurden modifizierte Peptide synthetisiert, welche mit einer reaktiven Seitenkette zur späteren Reaktion mit den entsprechenden Reaktanden oder einem Chromophor versehen wurden. Als Chromophor wurde Carboxyfluorescein verwendet, welches mit der Lysinseitenkette mit hohen Ausbeuten ligiert werden konnte. Die Funktionalisierung des Peptides RHAAC mit *N*-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl]-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid (Tetrazinylmaleinimid) über eine Additionsreaktion verlief nahezu quantitativ (Tabelle 4).

Tabelle 4. Struktur und Ausbeute der modifizierten Trypsinsubstrate. Die Reinheit der Substrate lag nach der chromatographischen Reinigung bei mindestens 95%.

	Chemische Struktur	Bezeichnung	Isolierte Ausbeute (%)
1	RHAAC-OH 	RHAAC(Tetrazin)-OH	90
2		RAHAK(5,6CF)-NH ₂ RAHAK(5,6CF)-OH RAAHK(5,6CF)-OH	60-90

5.1.2. REAKTANDSYNTHESE

Eigens zur chemischen Modifikation der enzymatisch in Proteine eingeführten Funktionalitäten wurden Alkin-, Alken-, Azid- und Tetrazinderivate synthetisiert. Hierzu wurden unterschiedliche Reaktionstypen verwendet. Die nicht kommerziell erhältlichen Alkenderivate wurden mit Hilfe der Wittig-Reaktion aus einer Phosphinkomponente und einem Aldehyd (siehe Abschn. Methoden) hergestellt und im Zuge einer Curtius-Reaktion aus einer Carbonsäurekomponente und einem Amin (siehe Abschn. Methoden) weiter derivatisiert. In einer davon unabhängigen Reaktion wurden

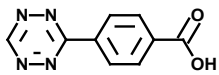
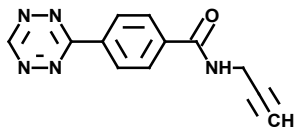
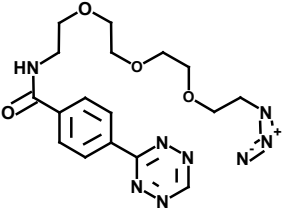
Derivate der durch die Wittig-Reaktion hergestellten Alkene wurden im Zuge einer nukleophilen Substitution erzeugt. Die Darstellung der Tetrazinderivate erfolgte in einer „Eintopfreaktion“ bestehend aus nukleophilen und elektrophilen Komponenten und anschließender Aromatisierung (siehe Abschn. Methoden). Derivate des Tetrazins wurden mit Hilfe nukleophiler Substitutionen der Carbonsäurekomponente synthetisiert; im Fall des Tetrazinylphenols wurden die Derivate phasentransferkatalysiert dargestellt. In den Tabellen 4-6 werden der IUPAC¹¹-Name und/oder die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung, die dazugehörige chemische Struktur¹² und die jeweils isolierte Syntheseausbeute nach der Aufreinigung angegeben. In Tabelle 8 werden IUPAC-Namen, Strukturen und die Syntheseausbeuten der verbleibenden Verbindungen angegeben, die keiner speziellen Substanzklasse zugeordnet werden können.

5.1.2.1. Tetrazinsynthesen

Die Tetrazinsynthesen verliefen mit einer sehr niedrigen Ausbeute von 5-10% im Fall von 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure und 4-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzoesäure. Die Synthese von 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol gelang mit einer Ausbeute von 40%. Die Nebenprodukte der Reaktionen wurden nicht analysiert. Bei den Tetrazinderivaten 4-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzoesäure und 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol handelt es sich um amorphe, rote Feststoffe; eine Kristallisation gelang trotz der Variation des Lösungsmittels nicht. Im Gegensatz hierzu konnte 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure kristallisiert werden.

Alle synthetisierten Tetrazinderivate zeigen eine erhöhte Reaktivität gegenüber nukleophilen Komponenten und demzufolge eine begrenzte Stabilität in Lösungsmitteln wie Wasser. Die Löslichkeit konnte in wässrigen Medien, im Hinblick auf die späteren Reaktionen an Biomolekülen, durch das Einbringen hydrophiler Esterkomponenten wie beispielsweise eines Polyethylenglykols (Tabelle 5) verbessert werden.

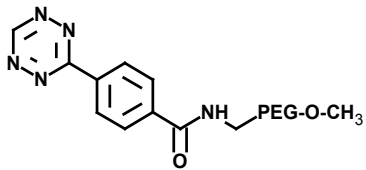
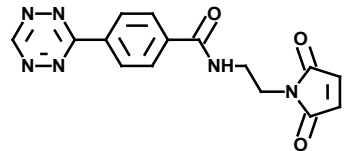
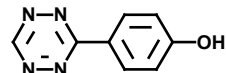
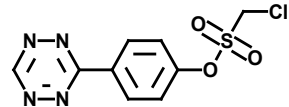
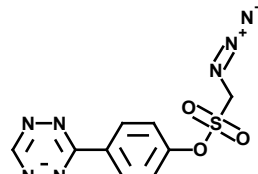
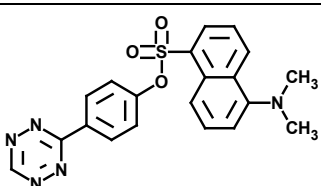
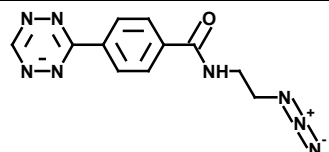
Tabelle 5. Strukturen und Ausbeuten der synthetisierten Tetrazinderivate. Die Reinheit der Substrate lag nach der chromatographischen Reinigung bei mindestens 95%.

	Chemische Struktur	Bezeichnung	Isolierte Ausbeute (%)
1		4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure	10
2		<i>N</i> -(2-Propinyl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)-benzamid	80
3		<i>N</i> -2-{2-[2-((2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy]ethyl}-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid	80

¹¹ International Union of Pure and Applied Chemistry

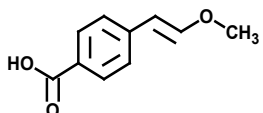
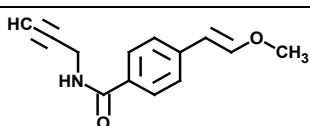
¹² dieser wurde mit Hilfe der Software ACD/Chemsketch® 11.0 erstellt

Strukturen und Ausbeuten der synthetisierten Tetrazinderivate. Die Reinheit der Substrate lag nach der chromatographischen Reinigung bei mindestens 95%. (Tabelle 5)

4		Methoxy-PEG-Tetrazinylbenzoat	50
5		<i>N</i> -[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid Tetrazinylmaleinimid	80
6		4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol	40
7		4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl chlormethansulfonat	90
8		4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl azidomethansulfonat	95
9		4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl 5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonat Dansyltetrazin	95
10		<i>N</i> -(2-Azidoethyl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid	70

5.1.2.2. Alken-Synthesen

Tabelle 6. Strukturen, Namen und Ausbeuten der nach Wittig synthetisierten Alkene und deren Derivate. Die Reinheit der Substrate lag nach der chromatographischen Reinigung bei mindestens 95%.

	Chemische Struktur	Bezeichnung	Isolierte Ausbeute (%)
1		4-[-2-Methoxyethenyl]benzoesäure	50-60
2		4-[-2-Methoxyethenyl]- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)benzamid	80

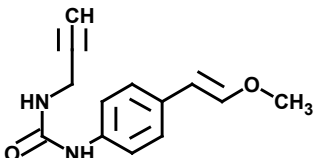
Die Wittig-Reaktion zur Synthese von 4-[2-Methoxyethenyl]benzoesäure lieferte eine Ausbeute von 50-60% eines Isomerengemischs aus 4-[(*E,Z*)-2-Methoxyethenyl]benzoesäure. Die Schlosser-Variante ^[118] der Wittig-Synthese führte ebenfalls zu einem Isomerengemisch.

Bei 4-[2-Methoxyethenyl]benzoesäure handelt es sich um einen farblosen, amorphen Feststoff, der in einer isolierten Ausbeute von 50-60% erhalten werden konnte (Tabelle 6, Nr. 1).

5.1.2.3. Curtius-Reaktion

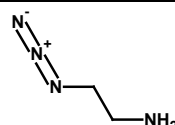
Curtius-Reaktionen wurden verwendet, um die Elektronendichte der Alkenfunktionalität in *para*-Position zu dem einzuführenden Substituenten des Styrenderivats zu verändern und damit die Möglichkeit einer inversen Cycloaddition mit den Tetrazinderivaten zu schaffen. Die Reaktionen verliefen mit einer hohen Ausbeute von 90%. Nach erfolgter Umlagerung durch Erhitzen im Wasserbad wurden die resultierenden Isocyanate mit Hilfe von Aminen zersetzt. Die so erhaltenen Harnstoffderivate wurden chromatographisch gereinigt und als farblose, amorphe Feststoffe gewonnen. Zum Ausbeuteverlust bei dieser Reaktion führte der erste Reaktionsschritt (Bildung von 4-[2-Methoxyethenyl]benzoyl azid aus 4-[2-Methoxyethenyl]benzoesäure und Natriumazid), der durch die geringe Löslichkeit von Natriumazid in organischen Medien in Wasser durchgeführt werden musste und deshalb nicht vollständig verlief.

Tabelle 7.. Strukturen, Namen und Ausbeuten der nach Curtius synthetisierten Alkene. Die Reinheit der Substrate lag nach der chromatographischen Reinigung bei mindestens 95%.

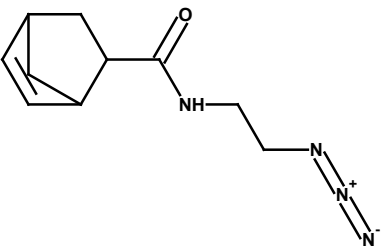
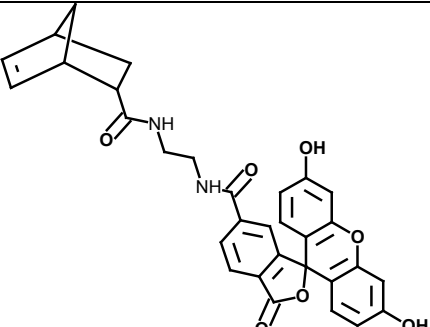
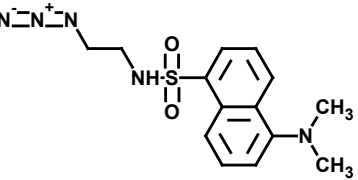
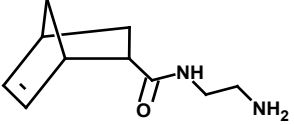
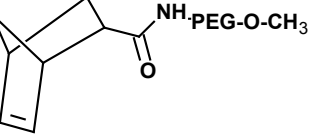
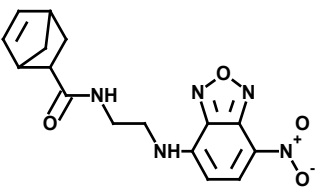
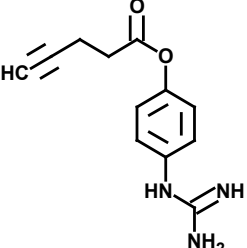
Chemische Struktur	Bezeichnung	Isolierte Ausbeute (%)
	1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-prop-2-yn-1-ylharnstoff	90

In Tabelle 8 werden die unterschiedlichen Substanzklassen zugehörigen chemischen Derivate, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, zusammengefasst. Hierbei handelt es sich mehrheitlich um Kondensationsreaktionen.

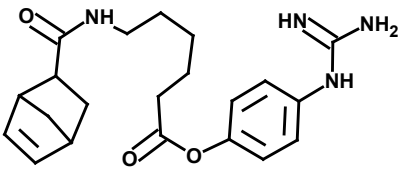
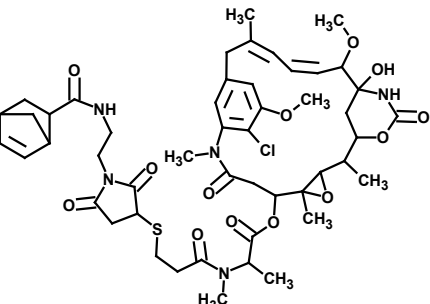
Tabelle 8. Strukturen, Namen und Ausbeuten von Syntheseprodukten. Die Reinheit der Substrate lag nach der chromatographischen Reinigung bei mindestens 95%.

	Chemische Struktur	Bezeichnung	Isolierte Ausbeute (%)
1		2-Azidoethanamin	60

Strukturen, Namen und Ausbeuten von Syntheseprodukten. Die Reinheit der Substrate lag nach der chromatographischen Reinigung bei mindestens 95%. (Tabelle 8)

2		<i>N</i> -(2-Azidoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid	80
3		Norbornen-Carboxyfluorescein Norb-CF	80
4		<i>N</i> -(2-Azidoethyl)-5-(dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamid Dansyl-Azid	95
5		<i>N</i> -(2-Aminoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid	80
6		[Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylcarbonyl]amino]methoxy-PEG _{10k} Norb-PEG	80
7		<i>N</i> -{2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethyl}bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid Norb-NBD	95
8		4-Guanidinophenyl4-pentinoat Pentinsäure-OGp PS-OGp	60

Strukturen, Namen und Ausbeuten von Syntheseprodukten. Die Reinheit der Substrate lag nach der chromatographischen Reinigung bei mindestens 95%. (Tabelle 8)

9		Norb-OGp	50
10		Norb-DM1	99

5.2. AUSWAHL DER ZU EXPRIMIERENDEN TRYPSIN VARIANTEN [107]

Neue Trypsinvarianten wurden durch rationales Enzym-Design ausgehend von Trypsiligase erstellt, welche neben der Spezifität für Tyr-Arg eine restriktive Histidinspezifität in der S_2' Bindungstasche aufweist [70]. Die Anforderung an die neu zu erstellende Trypsinvariante war eine Verschiebung der zinkabhängigen Histidinspezifität vom S_2' -Bindungsort der Trypsiligase in den S_3' -Bindungsort (TrypsiligaseII). Die Auswahl der zu variierenden Aminosäuren erfolgte nach rationellen Gesichtspunkten. So wurde anhand von Trypsin-Inhibitor-Röntgenkristallkomplexen in der Proteindatenbank pdb (pdbID: 1co7, 2ptc und 1tpa) die vermeintliche S_3' Bindungsregion im Trypsin identifiziert. In Abbildung 4 sind die unterschiedlichen Bindungsregionen dargestellt. Das Ergebnis dieses rationellen „in silico“ Ansatzes war die Identifizierung der Aminosäure Y39, die vermutlich für die S_3' Spezifität wesentlich verantwortlich ist.

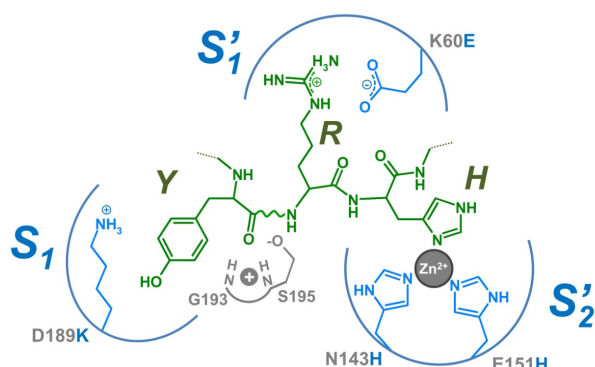


Tabelle 9. Vorgeschlagene Trypsinvarianten.

Nr.	Trypsinvariante
A	Tn K60E/D189K/F41H/N74H
B	Tn K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H
C	Tn K60E/D189K/F41H/Y59H
D	Tn K60E/D189K/N34H
E	Tn K60E/D189K/Y39H/N74H
F	Tn K60E/D189K/Y39H/I73H
G	Tn K60E/D189K/Y39H/I73H/N74H
H	Tn K60E/D189K/Y39H/Y59H

Abbildung 4. Bindungsregionen der Trypsiligase [69]. Dargestellt sind die artifizell eingefügten Mutationen der Trypsiligase incl. deren zugehörige Bindungsregion: S_1 (D189K), S_1' (K60E), S_2 (N143H und E151H). Die Bindungsspaltung des Peptids YRH (grün) erfolgt zwischen den Resten Tyrosin und Arginin durch Ser195 im aktiven Zentrum von Trypsiligase.

Da die neu zu erstellende Trypsinvariante eine induzierbare, zinkabhängige Histidinspezifität erhalten sollte, musste zur Stabilisierung des Zinkkomplexes ein weiterer Aminosäurerest ausfindig gemacht werden. Dieser wurde in Analogie zu bereits vorhandenen Trypsinvarianten über den Abstand von 2 Aminosäureresten (ca. 15 pm) zur optimalen Bindung von Zn^{2+} als Tyrosinrest Y59 identifiziert. Alle anderen neuartigen Enzyme basieren auf der Variante TrypsiligasII, indem die entsprechenden nativ vorhandenen Aminosäuren gegen Histidin ausgetauscht wurden (siehe Abschnitte 4.2. und 4.3.) Dabei erfolgte die Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu Y39. Hierzu zählen die Reste Y59, F41, N74 und I73, welche zu den Trypsinvarianten K60E/D189K/Y39H/Y59H; K60E/D189K/Y39H/I73H/N74H; K60E/D189K/F41H/N74H; K60E/D189K/Y39H/N74H; K60E/D189K/Y39H/I73H; K60E/D189K/I73H/N74H und K60E/D189K/Y59H/F41H kombiniert wurden. Um störende Einflüsse nativer, in der Trypsinsequenz vorkommender Histidinreste zu unterbinden und somit eine hohe Substratspezifität und gegebenenfalls eine Induzierbarkeit durch Zinkionen zu erreichen, wurde der Histidinrest H40 gegen Alanin getauscht. Somit konnte zusätzlich die Trypsinvariante K60E/D189K/H40A/Y39H/Y59H generiert werden. Die Positionen K60E und D189K wurden in jeder exprimierten Trypsinvariante beibehalten und dienen der katalytischen Effizienz und der Erkennung der Aminosäureseitenketten von Tyrosin und Arginin in den Substratpositionen P1 bzw. P1' (siehe Abschnitt 1.2.3.2.2. und 6.1) ^[65]. Tabelle 9 fasst die putativen Trypsinvarianten zusammen.

5.3. EXPRESSION UND REINIGUNG DER TRYPSINVARIANTEN

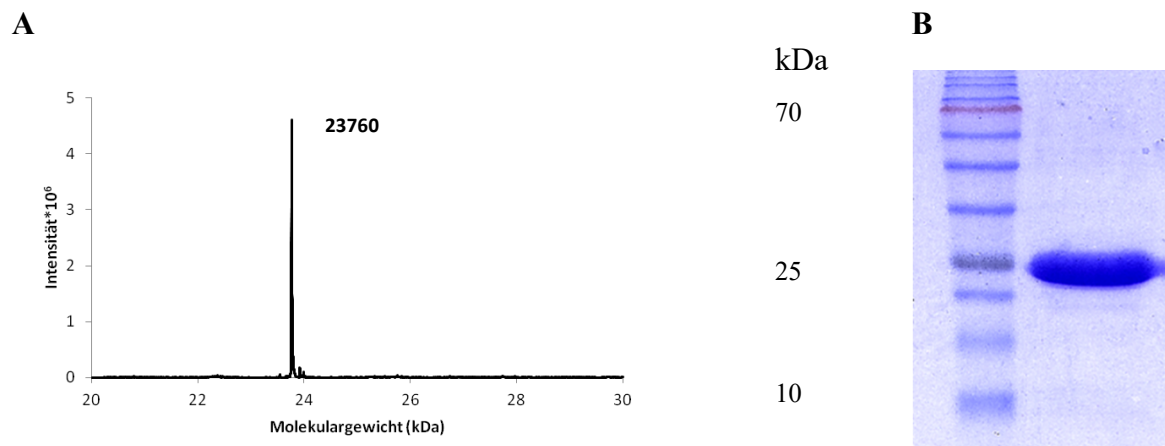


Abbildung 5. Chromatographische Aufreinigung der aktivierten TrypsiligasII, deren massenspektrometrische und gelelektrophoretische Identifizierung. A) Massenspektrometrische Analyse von TrypsiligasII. $MW_{\text{ber.}}$: 23759 Da, $MW_{\text{gef.}}$: 23760 Da [$M+H^+$]. B) SDS-PAGE von Tn K60E/D189K/Y39H/Y59H.

Die Trypsinvarianten wurden auf DNS-Ebene mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese („*site directed mutagenesis*“) erstellt und in den entsprechenden Wirtsorganismus (*E. coli*) zur Vervielfältigung der DNS transformiert. Die Identitäten aller verwendeten Trypsinvarianten wurden durch Sequenzanalysen bestätigt. Die Expression der einzelnen Trypsinvarianten erfolgte wie in Abschnitt 4.3.1. beschrieben als Zymogen in *Saccharomyces cerevisiae* und führte zu einem hochreinen Proteinprodukt. Mittels Enterokinase erfolgte die Überführung der Trypsinvarianten von ihrer „nicht aktiven“ Zymogen-Form in ihre aktive Enzym-Form. Das Ergebnis der Aufreinigung mittels Perfusionschromatographie unmittelbar nach der Aktivierung der Trypsinvariante durch Enterokinase ist in Abbildung 5 A beispielhaft an der Trypsinvariante Tn K60E/D189K/Y39H/Y59H (TrypsiligasII) dargestellt. Die finale massenspektrometrische Analyse ist in Abbildung 5 B gezeigt.

Alle Enzymvarianten konnten mit einer finalen Ausbeute von 5 mg Protein je Liter Kulturmedium mit einer Reinheit >95% erhalten werden.

5.4. CHARAKTERISIERUNG DER TRYPSINVARIANTEN

5.4.1. INITIALE HYDROLYSESTUDIEN

Zur Ermittlung der Histidinspezifität sowie der Zinkinduzierbarkeit der generierten Trypsinvarianten wurden Hydrolysestudien zunächst mit den Modellpeptiden Bz-AAYRAAG-OH, Bz-AAYRHAAG-OH und Bz-AAYRAHAAG-OH durchgeführt. Die Auswahl der Peptidsubstrate erfolgte im Hinblick auf eine Variation der Position des Histidinrestes unter Berücksichtigung der restriktiven Spaltsequenz Tyr-Arg. Bz-AAYRAAG-OH wurde als Histidinfreies Peptid zu Referenzzwecken in die Studien einbezogen.

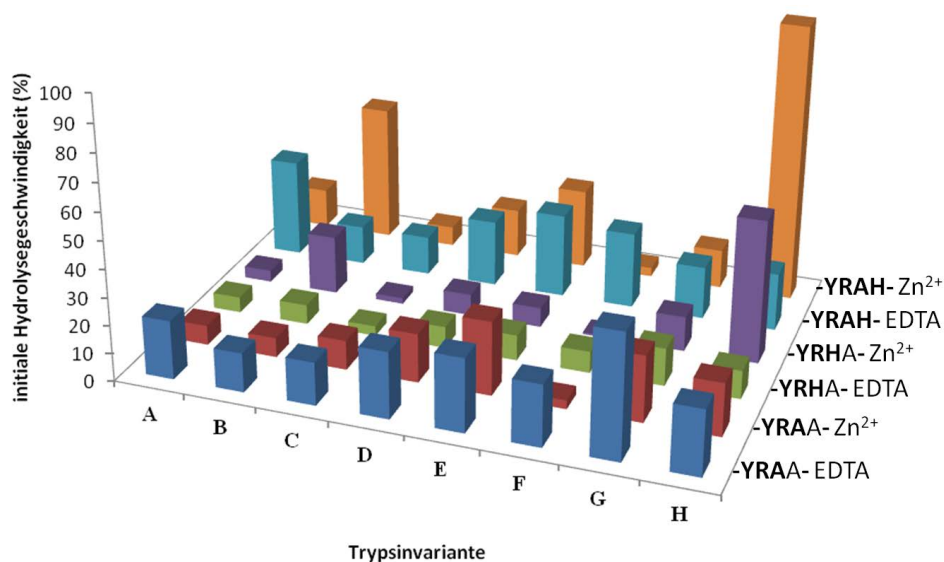


Abbildung 6. Ermittlung der Spezifität, Kinetik und Zn²⁺-Induzierbarkeit einzelner Trypsinvarianten. 1 mM Peptid, 10 μ M Trypsinvariante, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂/EDTA; pH 8; 30 °C A: F41H/N74H; B: Y39H/H40A/Y59H; C: F41H/Y59H; D: N34H; E: Y39H/N74H; F: Y39H/I73H; G: Y39H/I73H/N74H; H: Y39H/Y59H (TrypsiligaseII). Alle Trypsinvarianten besitzen, zusätzlich zu den angegebenen Aminosäureaustauschen, die Aminosäureaustausche K60E und D189K. Als Spaltpeptide wurden verwendet: Bz-AAYRAAG-OH, Bz-AAYRHAAG-OH und Bz-AAYRAHAAG-OH. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten in prozentualen Anteilen bezogen auf die Trypsinvariante mit der höchsten Umsatzrate TrypsiligaseII angegeben. Die angegebenen Werte stammen aus einer Dreifachbestimmung. Der Fehler lag unter 3%.

Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, sind alle getesteten Trypsinvarianten in der Lage, die ausgewählten Peptide mit Histidinseitenketten in den Positionen P₂' und P₃' zu hydrolysieren. Ebenfalls umgesetzt wird das Vergleichspeptid ohne Histidin in der Sequenz (Bz-AAYRAAG-OH). Dabei sind prinzipiell Unterschiede bezüglich der Hydrolysegeschwindigkeit und der von der Position der Histidinseitenkette (P₂' oder P₃') abhängigen zinkvermittelten Induzierbarkeit der Hydrolysereaktion zu erkennen. So setzt die TrypsiligaseII (Abbildung 6 H) im Vergleich zu allen anderen getesteten Trypsinvarianten das Peptid Bz-AAYRAHAAG-OH mit der höchsten initialen Hydrolysegeschwindigkeit um; wobei eine hohe Umsatzrate ausschließlich in Gegenwart von Zinkionen erreicht wird. Eine um ca. die Hälfte geringere Hydrolysegeschwindigkeit wird von der Trypsinvariante Tn K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H (Abbildung 6 B) realisiert, wobei die Induzierbarkeit durch Zinkionen erhalten bleibt.

Alle anderen getesteten Varianten zeigen keine zinkabhängige Spaltung des Peptids mit der Histidinseitenkette in der P₃ Position und weisen zudem nur sehr geringe initiale Hydrolysegeschwindigkeiten im Vergleich zu TrypsiligaseII auf (Abbildung 6 H).

Das formulierte Ziel der Erzeugung einer Trypsinvariante mit einer zinkabhängigen Histidinspezifität in einer anderen Position als P₂ konnte somit in einem initialen Experiment für die Trypsinvariante Tn K60E/D189K/Y39H/Y59H (TrypsiligaseII) bestätigt werden. In weiteren Studien wurde ausschließlich TrypsiligaseII als vielversprechendster Kandidat weiterverwendet. Um die zinkabhängige S₃-Spezifität für Histidinseitenketten in der entsprechenden Position des Substrates zu quantifizieren, wurden die kinetischen Parameter k_{cat} und K_M für die Hydrolyse der Modellpeptide Bz-AAYRHAAAG-OH, Bz-AAYRAHAAG-OH und Bz-AAYRAAHAG-OH bestimmt (siehe Tabelle 10; Abbildung 7).

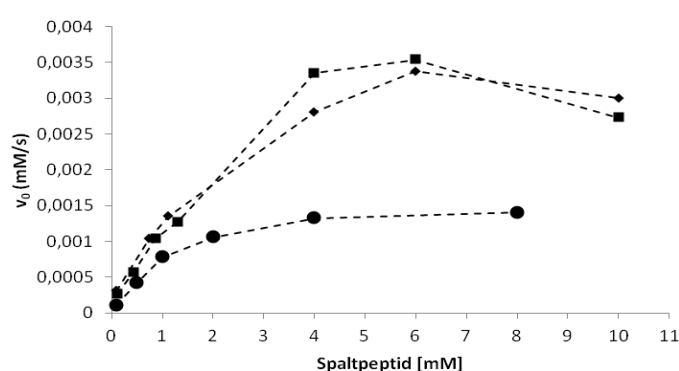


Abbildung 1. V/S Charakteristik der durch TrypsiligaseII katalysierten Hydrolyse der Spaltpeptide Bz-AAYRHAAAG-OH (●), Bz-AAYRAHAAG-OH (◆) und Bz-AAYRAAHAG-OH (■). Die angegebenen Werte stammen aus einer Dreifachbestimmung. Der Fehler lag unter 3%.

Die V/S-Charakteristik in Abbildung 7 zeigt die bei definierten Peptidkonzentrationen ermittelten initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der drei Spaltpeptide. Die Hydrolyse des Peptids Bz-AAYRHAAAG-OH zeigt eine typische v/s-Charakteristik im Sättigungsbereich, wohingegen bei den Proteolysesubstraten Bz-AAYRAHAAG-OH und Bz-AAYRAAHAG-OH die initiale Hydrolysegeschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen, vermutlich durch eine Substrathemmung, wieder abnimmt. Um dennoch einen K_M -Wert ermitteln zu können, musste dieser anhand der Substratkonzentrationen im unteren Sättigungsbereich ermittelt werden ^[119]. Tabelle 10 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 1. Kinetische Parameter von TrypsiligaseII für die Hydrolyse von Bz-AAYRHAAAG-OH, Bz-AAYRAHAAG-OH und Bz-AAYRAAHAG-OH. Reaktionsbedingungen: 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂; [TrypsiligaseII]: 10 μ M; pH 7,8; 30 °C

	k_{cat} (1/s)	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ s ⁻¹]
Bz-AAYRHAAAG-OH	0,19	1,61	0,11
Bz-AAYRAHAAG-OH	0,23	0,64	0,35
Bz-AAYRAAHAG-OH	0,23	0,78	0,29

Die angegebenen Werte stammen aus einer Dreifachbestimmung. Der Fehler lag unter 3%.

Unter der Annahme, dass die Acylierungsgeschwindigkeiten für die in Tab. 10 gemessenen Peptide gleich bleiben, stellt das Modellpeptid Bz-AAYRAHAAG-OH mit einem Wert für K_M von 0,64 mM

das Peptid mit der höchsten Affinität zur Trypsinvariante bezüglich seiner Hydrolyse dar. Das Modellpeptid mit der Histidinseitenkette in der P₄'-Position (Bz-AAYRAAHAG-OH) hat einen um einen Faktor von 1,2 höheren Wert für K_M. Einen um einen Faktor von 2,5 höheren K_M-Wert zeigt die Hydrolyse des Peptides mit der Histidinseitenkette in der P₂'-Position. Die Wechselzahl von 0,19*s⁻¹ liegt um einen Faktor von 1,2 niedriger als die Wechselzahlen für die Peptide mit den Histidinseitenketten in den Positionen P₃' und P₄'. Deren Wechselzahlen sind mit einem Wert von 0,23*s⁻¹ identisch. Die Substratspezifität (k_{cat}/K_M) ist mit einem Wert von 0,35 mM⁻¹s⁻¹ am höchsten für das Substrat Bz-AAYRAHAAG.

Um zu zeigen, dass die Trypsinvariante TrypsiligaseII auch zur spezifischen Hydrolyse der Erkennungssequenz in größeren Biomolekülen befähigt ist, wurden Studien an einem Modellprotein, der PPIase Cyclophilin 18 durchgeführt. Cyclophilin 18 wurde N-terminal mit einer Strep-Fusion zur Aufreinigung des Konstrukts und der für TrypsiligaseII ermittelten Erkennungssequenz -YRAH- versehen. Am C-Terminus wurde das Konstrukt mit der Erkennungssequenz -YRHAAG- (Erkennungssequenz für Trypsiligase) versehen.

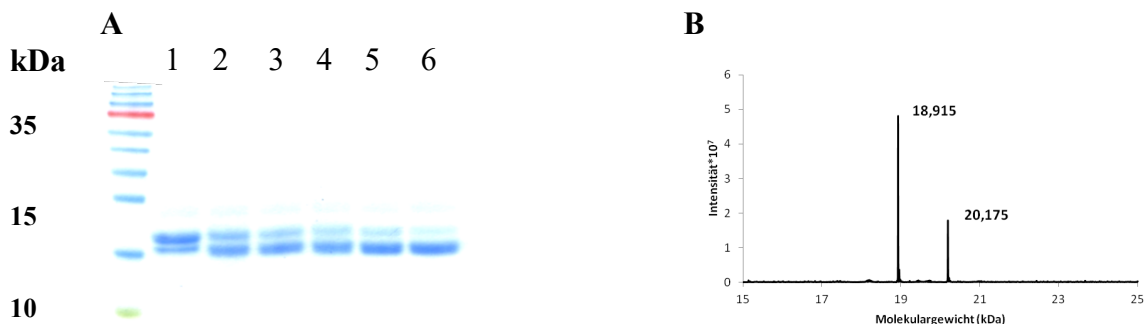


Abbildung 8. TrypsiligaseII-katalysierte Abspaltung des Strep-Fusionspeptids von Strep-YRAH-Cyclophilin18-YRHAAG. Reaktionsbedingungen: 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 μM ZnCl₂; 10 μM Tn K60K/D189K/Y39H/Y59H; pH 8; 30 °C. 5 h. A: Polyacrylamidgelelektrophorese. 1: 0 h; 2: 1 h; 3: 2 h; 4: 3 h; 5: 4 h; 6: 5 h. B: Bestimmung des Molekulargewichts nach 2h. Strep-YRAH-Cyp18-YRHAAG: MW_{ber.}: 20,174 kDa; MW_{gef.}: 20,175 kDa [M+H⁺]; MW_{ber.}: 18,914 kDa; MW_{gef.}: 18,915 kDa [M+H⁺].

Abbildung 8A zeigt den zeitlichen Verlauf von null bis sechs Stunden der Hydrolyse des Strep-Fusionspeptids, welches über die für TrypsiligaseII spezifische Sequenz -YRAH- mit Cyclophilin18 fusioniert vorlag. Bereits zum ersten gemessenen Zeitpunkt (Abbildung 8 A; 1) kann eine zweite Bande im SDS-Polyacrylamidgel detektiert werden, welche in ihrer Intensität im weiteren Verlauf zunimmt. Nach einem Zeitraum von 5 h kann massenspektrometrisch das gewünschte Reaktionsprodukt RAH-Cyclophilin18-AYRHAAG nachgewiesen werden (Abbildung 8 B). Nach sechs Stunden liegt die Strep-Fusion beinahe vollständig hydrolysiert vor (Abbildung 8 A; untere Bande). Aufgrund der experimentellen Ergebnisse kann festgestellt werden, dass TrypsiligaseII neben der bereits beschriebenen Umsetzung von His-haltigen Peptiden ebenso zur Hydrolyse der Erkennungssequenz -YRAH- in Verbindung mit vollständigen Proteinen bzw. Biomolekülen befähigt ist. Des Weiteren zeigt die massenspektrometrische Analyse, dass im Analysenzeitraum ausschließlich die gewünschte Sequenz von der Trypsinvariante gespalten wird; Proteolyse an anderen Aminosäurepositionen traten dagegen nicht auf.

5.4.2. INITIALE ACYLTRANSFERREAKTIONEN

Die im Zuge von Hydrolysereaktionen bestätigte zinkinduzierte Substratspezifität für Histidinseitenketten in P₃'-Position (siehe 5.4.1.) sollte mit Hilfe initialer Acyltransferreaktionen verifiziert werden. Die Acyltransferreaktion stellt formal gesehen eine N-terminale Modifikation der dafür vorgesehenen Modellpeptide RHAAK(5,6CF), RAHAK(5,6CF) und RAAHK(5,6CF) dar. Als Acyldonor wurde das Substratmimetikum Boc-Ala-OGp verwendet. Im Vorfeld wurde die Zeit ermittelt, die benötigt wird, um den Ester Boc-Ala-OGp in Abwesenheit des Nukleophils enzymatisch vollständig zu hydrolysieren. In Abhängigkeit der Konzentrationen an Acyldonor und Acylakzeptor unter Berücksichtigung der ermittelten Reaktionszeit von 80 Minuten wurde ermittelt welche Sequenz mit der höchsten Effizienz zu Boc-A-RXXXX(5,6CF) umgesetzt wird (Abbildung 9).

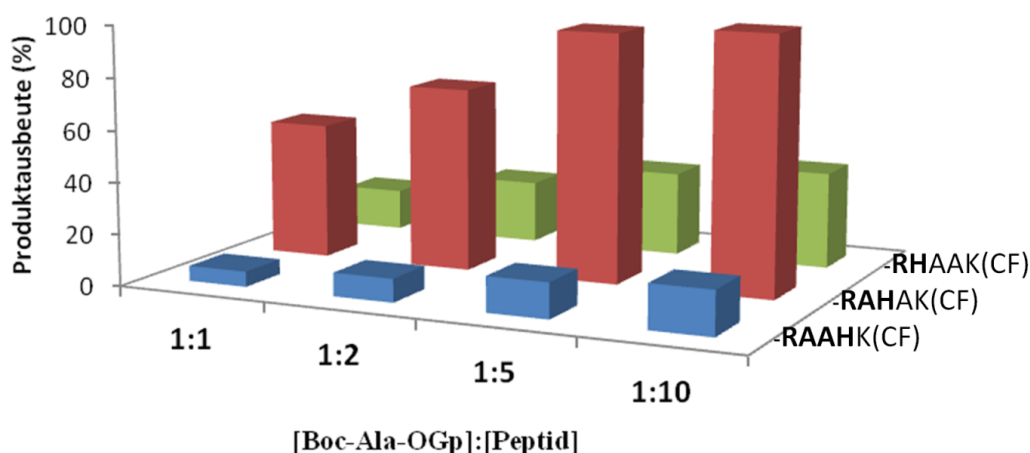


Abbildung 9. Trypsiligasell katalysierter Acyltransfer von Boc-Ala-OGp und Histidinhaltenen Peptiden unter Einsatz variierender Konzentrationsverhältnisse des Acylakzeptors. 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 100 µM ZnCl₂; pH 7,8; 80 min; 30 °C. [Boc-Ala-OGp]: 100 µM; [Peptid]: 100 µM (1:1); 200 µM (1:2); 500 µM (1:5), 1 mM (1:10); [Trypsiligasell]: 10 µM

Abbildung 9 zeigt eine deutliche Präferenz der Trypsiligasell für Histidinreste in der P₃'-Position. So werden mit dem Acylakzeptor RAHAK(5,6CF) Ausbeuten in einem Bereich von 54% -100% erreicht. Die Syntheseeffizienz bzw. Ausbeute ist dabei signifikant vom verwendeten Verhältnis aus Acyldonor und Acylakzeptor unter den gewählten Bedingungen abhängig; bei einem 5-fachen Überschuss an Acylakzeptor verläuft die Acyltransferreaktion quantitativ. Die Ligationsreaktionen von Boc-Ala-OGp und Acylakzeptorpeptiden mit Histidinseitenketten in den Positionen P₂' und P₄' weisen prinzipiell dieselbe Abhängigkeit der Produktausbeute von der Nukleophilkonzentration auf. Wie aus den initialen Hydrolysereaktionen und der Bestimmung der Spezifitätskonstanten im Abschnitt 5.4.1. zu erwarten war, resultierte der Einsatz von Acylakzeptoren mit Histidinseitenketten in den Positionen P₂' bzw. P₄' allerdings in deutlich niedrigeren Produktausbeuten von 16%-38% für RAAHK(5,6CF) und lediglich 6%-17% im Fall von RHAAK(5,6CF).

Nachdem die erfolgreiche Modifizierung von Peptiden mittels Boc-Ala-OGp demonstriert werden konnte, erfolgten in weiteren Schritten Acyltransferreaktionen mit nicht aminosäureartigen 4-Guanidinophenylestern. Als Modell wurde der chemische Anker 4-Pentinsäure ausgewählt und mit 4-Guanidinophenol verestert. Die Ergebnisse der Acyltransferreaktion der Trypsiligasell sollten mit denen der Trypsiligase verglichen werden. Gemäß der individuellen S' His-Spezifität der jeweiligen

Trypsinvariante wurden deshalb die Peptide RHAK(5,6CF)-OH und RAHAK(5,6CF)-OH als Acylakzeptoren verwendet.

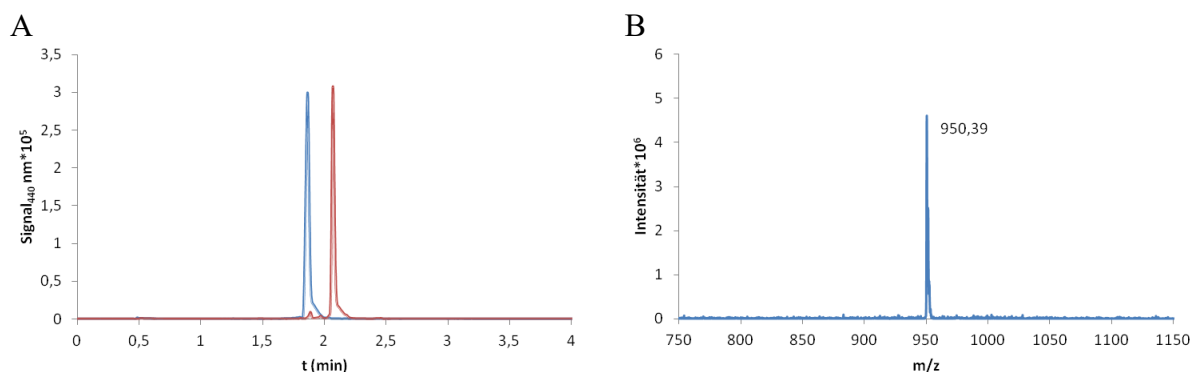


Abbildung 10. Chromatographische und massenspektrometrische Analyse der durch Tn K60E/D189K/N143H/E151H katalysierten Reaktion zwischen Pentinsäure-OGp (PS-OGp) und RHAK(6CF). 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 100 μM ZnCl₂, pH 7,8, 30 °C. [RHAK(6CF)]: 1 mM; [PS-OGp]: 2 mM, [Trypsin]: 20 μM; 3 h. **A:** UPLC Chromatogramm der Acyltransferreaktion. Null Stunden (blau); eine Stunde (rot). **B:** Massenspektrometrie Acyltransfer RHAK auf PS-OGp; $m/z_{\text{ber.}}$ PS-RHAK(6CF): 949,3; $m/z_{\text{gef.}}$ 950,39 [M+H⁺].

Wie Abbildung 10 demonstriert, wurde auch der nichtaminosäureartige Pentinsäure-4-Guanidinophenylester von der verwendeten Trypsiligase innerhalb einer Stunde nahezu quantitativ bei einem Acylakzeptor:Acyldonor-Verhältnis von 1:2 zum Produkt umgesetzt. Es entstand Pentinsäure-RHAK(6CF)-OH, welches massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden konnte.

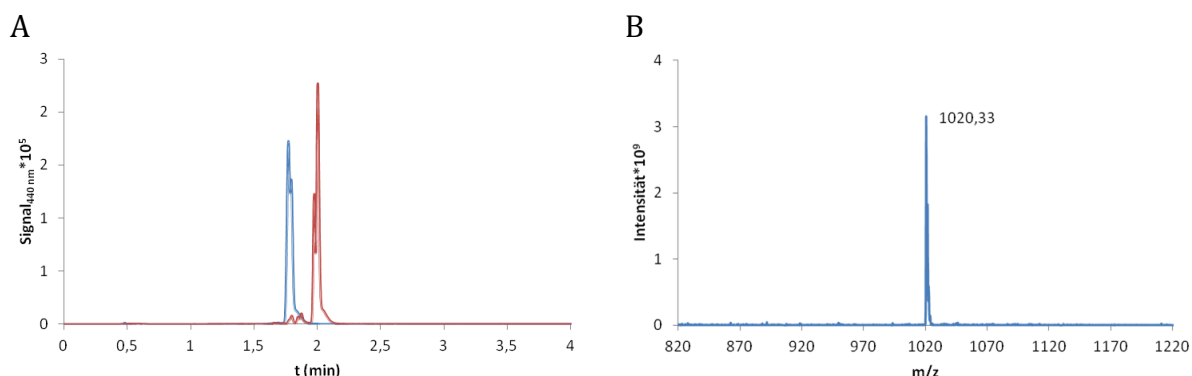


Abbildung 11. Chromatographische und massenspektrometrische Analyse der durch TrypsiligaseII katalysierten Reaktion zwischen PS-OGp und RAHAK(5,6CF). 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 100 μM ZnCl₂, pH 7,8, 30 °C. [RAHAK(5,6CF)-NH₂]: 1 mM; [PS-OGp]: 2 mM, [Trypsin]: 20 μM; 1 h. **A:** UPLC-Chromatogramm der Acyltransferreaktion. Null Stunden (blau); eine Stunde (rot). **B:** Massenspektrometrie Acyltransfer PS-OGp auf RAHAK(5,6CF)-NH₂. $m/z_{\text{ber.}}$ PS-RAHAK(5,6CF)-NH₂: 1019,3; $m/z_{\text{gef.}}$ 1020,33 [M+H⁺]

Wie dem Chromatogramm in Abbildung 11A zu entnehmen ist, katalysiert ebenso die TrypsiligaseII die Acyltransferreaktion zwischen 4-Pentinsäure-OGp (PS-OGp) und RAHAK(5,6CF)-NH₂ und führt bereits nach einer Stunde zu einem nahezu vollständigen Umsatz. Das Acyltransferprodukt PS-RAHAK(5,6CF)-NH₂ konnte massenspektrometrisch eindeutig nachgewiesen werden. Da nicht isomerenreines Carboxyfluorescein sondern ein Isomeregemisch aus 5-Carboxyfluorescein und 6-Carboxyfluorescein (5,6CF) verwendet wurde, sind in Abbildung 11A Doppelpeaks zu sehen.

In einem weiteren Experiment wurde Norb-OGp (Norboren-OGp; Tabelle 8, Nr. 9) als Acyldonor mit Trypsiligase als Katalysator verwendet (Abbildung 12). Auch diese Acyltransferreaktion verläuft mit

nahezu quantitativen Ausbeuten (Abb. 12A) zu dem gewünschten Produkt Norb-RHAK(6CF)-OH (Abb. 12B). Die Reaktionszeit betrug 90 Minuten.

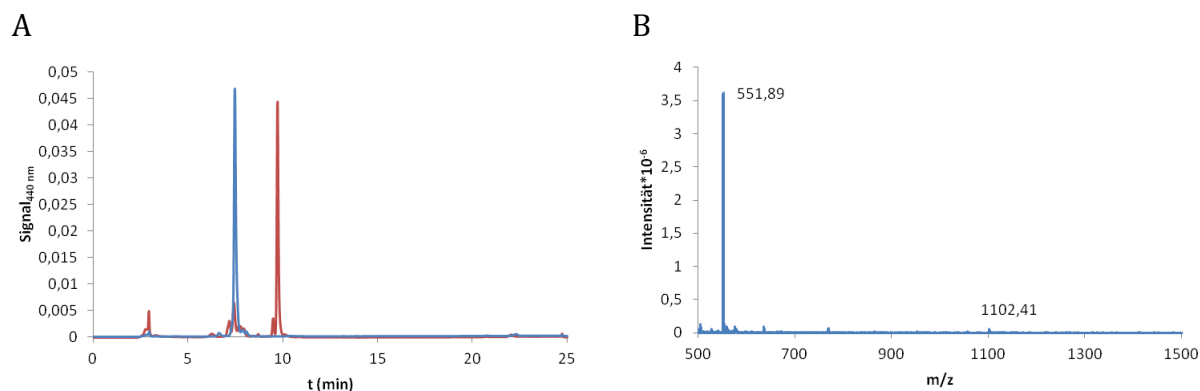
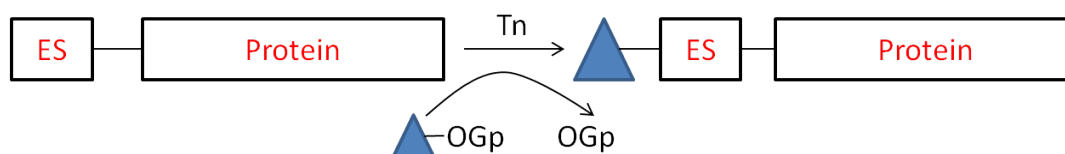


Abbildung 12. Chromatographische und massenspektrometrische Analyse der durch Trypsiligase katalysierten Reaktion zwischen Norb-OGp und RHAK(6CF). 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 100 μM ZnCl₂, pH 7,8, 30 °C. [RHAK(6CF)-NH₂]: 1 mM; [Norb-OGp]: 2 mM, [Trypsiligase]: 20 μM; 1 h. **A:** UPLC-Chromatogramm der Acyltransferreaktion. Null Stunden (blau); 90 Minuten (rot). **B:** Massenspektrometrie Acyltransfer von RHAK(6CF) auf Norb-OGp. m/z_{ber.} Norb-RHAK(6CF)-OH: 1101; m/z_{gef.}: 1102,41 [M+H⁺]

Trypsiligase I und II sind somit in der Lage, OGp-Ester zu stabilen Acyltransferprodukten zu ligieren umzusetzen. Die verwendeten Ester können demnach im Weiteren als Acyldonorkomponenten eingesetzt werden.

5.5. STUDIEN ZUR *N*-TERMINALEN DERIVATISIERUNG VON PROTEINEN

In Abschnitt 5.4.2. konnte gezeigt werden, dass Acyltransferreaktionen unter Einsatz von Boc-Ala-OGp, Pentinsäure-OGp und Norb-OGp als Acyldonoren und den Peptiden RHAK(6CF).OH und RAHAK(5,6CF)-NH₂ als Acylakzeptor katalysiert durch Trypsiligase I und II hohe Ausbeuten liefern. Basierend auf den Erkennungssequenzen **YRH** und **YRAH** sollten gemäß Schema 4 die Proteine hPIN1, Parvulin10 und Cyclophilin18 (CyP18) *N*-terminal mit der entsprechenden Erkennungssequenz **YRH** und/oder **YRAH** versehen und modifiziert werden.



Schema 4. Schematische Darstellung der *N*-terminalen Modifikation von Proteinen vermittelt durch OGp-Ester. ES: Erkennungssequenz ▲: Modifikation

In den Abschnitten 5.5.1 bis 5.5.4 werden die Ergebnisse der *N*-terminalen Modifizierungsreaktionen vorgestellt. Die Ergebnisse werden belegt mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen, die jeweils ohne weitere Aufreinigung der Syntheseprodukte unmittelbar nach Beendigung der Reaktion aufgenommen wurden. Hierbei sollen Schemata innerhalb der Abbildungen den Reaktionsfortgang noch einmal zusammenfassen.

5.5.1. N-TERMINALE MODIFIZIERUNG VON PIN1

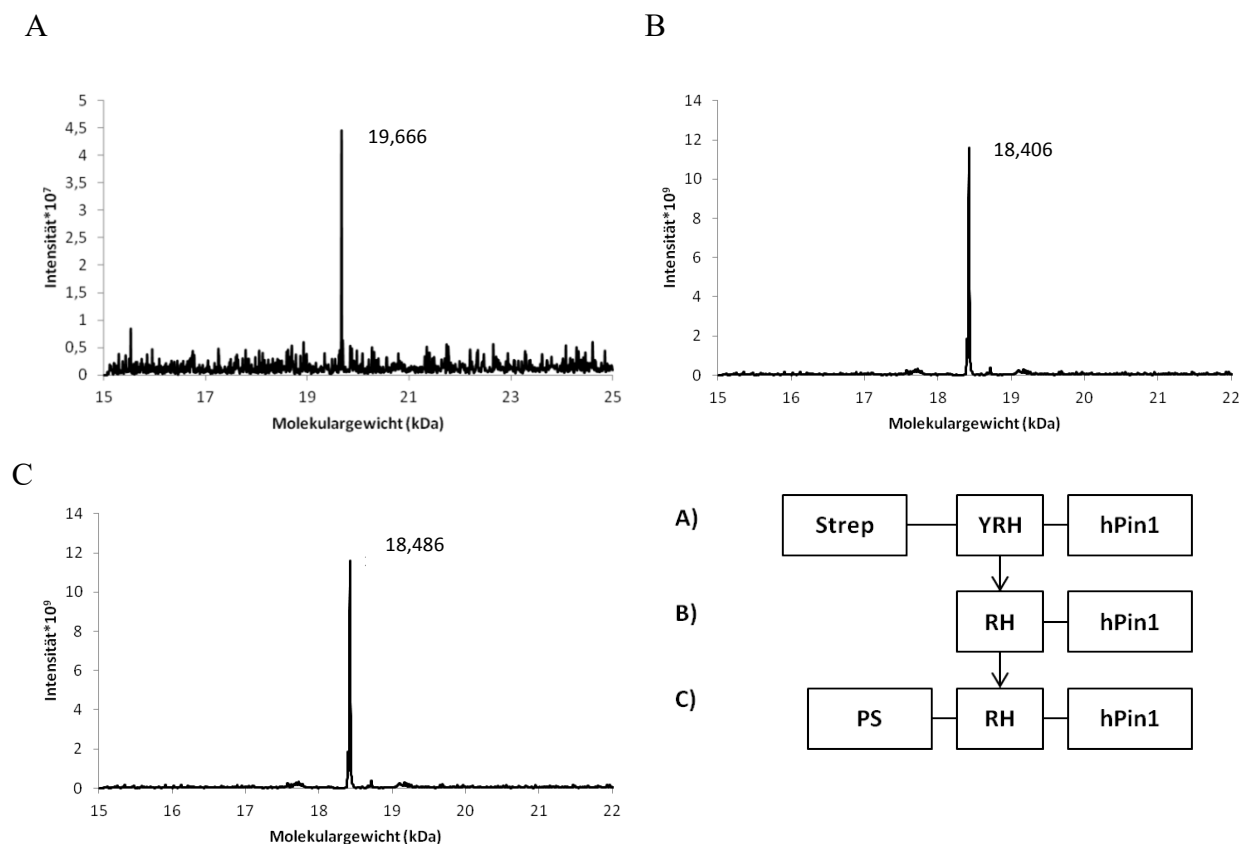


Abbildung 13. Massenspektrometrische Analyse der durch Trypsiligase katalysierte Modifizierung von Strep-YRH-Pin1-OH mit 4-Pentinsäure. 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl_2 ; 50 μM ZnCl_2 ; pH 7,8; 30°C. [*hPin1*]: 200 μM ; [Trypsiligase]: 50 μM ; [PS-OGp]: 1 mM **A:** Strep-YRH-Pin1. $\text{MW}_{\text{ber.}}$: 19,665 kDa; $\text{MW}_{\text{gef.}}$: 19,666 kDa [M+H⁺]. **B:** RH-Pin1. $\text{MW}_{\text{ber.}}$: 18,405 kDa; $\text{MW}_{\text{gef.}}$: 18,406 kDa [M+H⁺]. **C:** PS-RH-hPin1. $\text{MW}_{\text{ber.}}$: 18,485 kDa; $\text{MW}_{\text{gef.}}$: 18,486 kDa [M+H⁺]. Zusätzlich gezeigt ist eine schematische Darstellung des Reaktionsfortschritts der Modifizierung A) Edukt; B) Hydrolyse; C) N-terminale Modifizierung mit Pentinsäure (PS-OGp)

Mit dem Ziel der Einführung chemischer Anker in ausgewählte Modellproteine wurde zunächst humanes Pin1 (*hPin1*) mit einer N-terminalen Strep-Fusion und der Erkennungssequenz -YRH- verwendet. Als Trypsinvariante kam aufgrund der Spezifität für Histidinreste in S₂-Position Trypsiligase zum Einsatz. Als Acyldonor wurde der im Rahmen initialer Studien getestete OGp-Ester der 4-Pentinsäure verwendet (Abschnitt 5.4.1.). Abbildung 13 beschreibt den Fortgang der mittels Trypsiligase katalysierten N-terminalen Modifizierungsreaktion von *hPin1* mit Pentinsäure. Die Modifizierung erfolgte in zwei aufeinander folgenden Schritten. Vor der eigentlichen enzymatischen Modifizierungsreaktion wurde in einem initialen Schritt das Strep-Fusionspeptid von Strep-YRH-*hPin1* (19,666 kDa; siehe Abbildung 13A) durch die Trypsiligase innerhalb von zwei Stunden vollständig und selektiv abgespalten. Da die Trypsiligase zwischen Tyrosin und Arginin innerhalb der Konsensussequenz YRH spaltet, entsteht das Fragment RH-*hPin1*-OH (18,406 kDa; siehe Abbildung 13 B). In einer darauf folgenden Reaktion, der eigentlichen Acyltransferreaktion, erfolgte die N-terminale Modifizierung von *hPin1* mit Pentinsäure (18,486 kDa; Abbildung 13 C). Die relative Massendifferenz zwischen PS-RH-*hPin1* und RH-*hPin1* entspricht der der ligierten 4-Pentinsäure. Die Reaktionszeit der Acyltransferreaktion betrug unter den angegebenen Reaktionsbedingungen und verwendeten Konzentrationsverhältnissen (Acyldonor:Acylakzeptor 1:5) 30 Minuten.

Das erwünschte Produkt PS-RH-*hPin1*-OH konnte mit einer nahezu quantitativen Produktausbeute dargestellt werden; massenspektrometrisch ließ sich kein Edukt mehr nachweisen. In Kontrollexperimenten (nicht gezeigt) ohne Zugabe des Enzyms Trypsiliginase konnte kein spontaner Acyltransfer des Esters PS-OGp auf das Protein *hPin1* festgestellt werden. Somit ist es auf enzymatischem Wege gelungen, *hPin1* vollständig mit 4-Pentinsäure zu modifizieren. Das Protein *hPin1* kann somit in einem weiteren Schritt chemoselektiv an der Alkinfunktionalität der Pentinsäure weiter modifiziert werden (siehe Abschnitt 5.8.2).

5.5.2. N-TERMINALE MODIFIZIERUNG VON *E. COLI* PARVULIN10

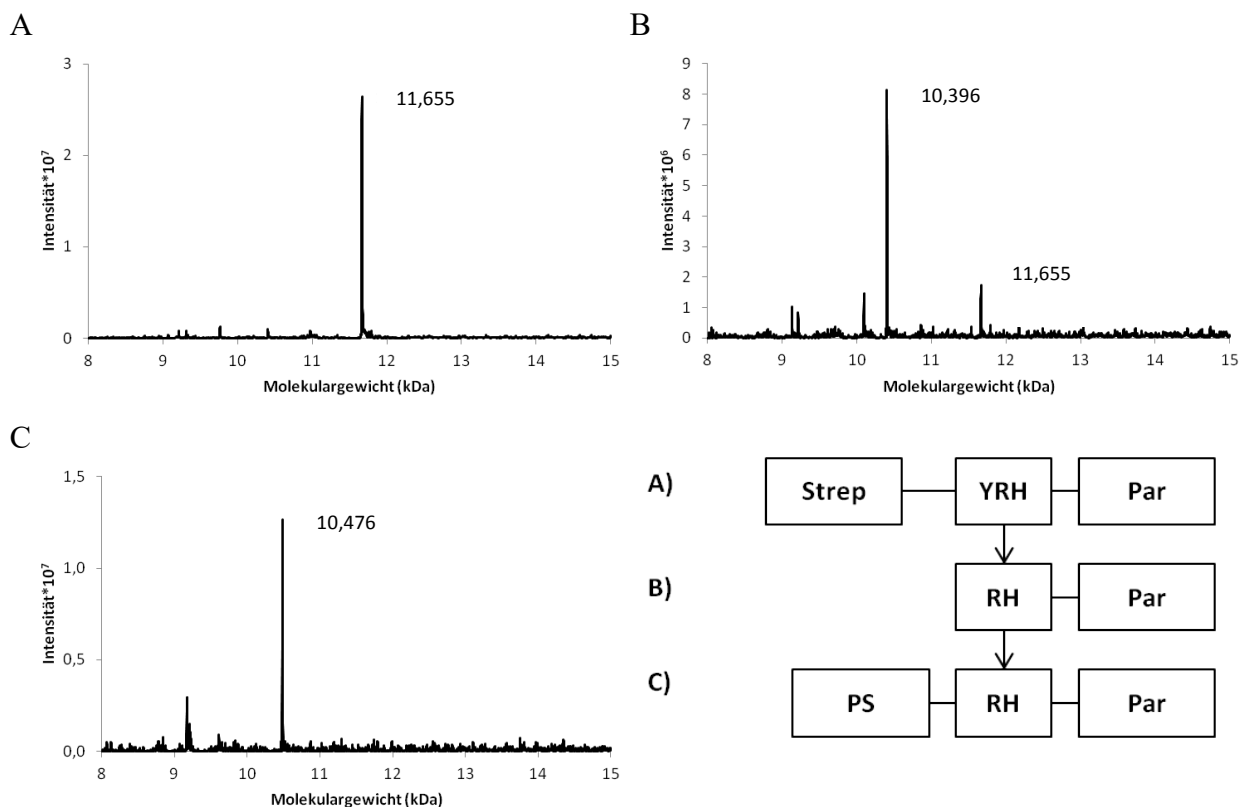


Abbildung 14. Massenspektrometrische Analyse der durch die Trypsiliginase katalysierte Modifizierung von *E. coli* Strep-YRH-Par10-OH mit 4-Pentinsäure. 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 50 μM ZnCl₂; pH 7,8; 30°C. [Parvulin10]: 200 μM; [Trypsiliginase]: 10 μM; [PS-OGp]: 1 mM **A:** Strep-YRH-Par10. MW_{ber.}: 11,654 kDa; MW_{gef.}: 11,655 kDa [M+H⁺]. **B:** RH-Par10. MW_{ber.}: 10,394 kDa; MW_{gef.}: 10,396 kDa [M+H⁺]. **C:** PS-RH-Par10, MW_{ber.}: 10,474 kDa; MW_{gef.}: 10,476 kDa [M+H⁺]. Zusätzlich gezeigt ist eine schematische Darstellung des Reaktionsfortgangs der Modifizierung A) Edukt; B) Hydrolyse; C) N-terminale Modifizierung mit Pentinsäure (PS-OGp)

Als weiteres zu modifizierendes Protein wurde *E. coli* Parvulin10 als Acylakzeptor ausgewählt. Acyldonor war wiederum 4-Pentinsäure-OGp. Katalysiert wurde die Reaktion von Trypsiliginase, da das Zielprotein *E. coli* Parvulin10 die für diese Trypsinvariante spezifische Erkennungssequenz -YRH- an ihrem N-terminalen Ende enthielt. Wie *hPin1* lag auch Parvulin10 N-terminal mit der der Aufreinigung dienenden Aminosäuresequenz (Strep-Tag) fusioniert vor (11,65 kDa siehe Abbildung 14 A). In einem ersten Schritt wurde diese Strep-Fusion enzymatisch entfernt. Die Reaktionszeit für die Abspaltung des Strep-Fusionspeptids von *E. coli* Par10 durch Trypsiliginase betrug zwei Stunden. Das Protein RH-Par10 mit einem ermittelten Molekulargewicht von 10,396 kDa entstand. (Abbildung 14 B). Das Molekulargewicht von 11,655 kDa des noch intakten Edukts Strep-YRH-Par10 konnte

ebenfalls nach dieser Reaktionszeit noch nachgewiesen werden (Abbildung 14 B). Die Acyltransferreaktion von RH-Par10-OH auf 4-Pentinsäure-OGp betrug 30 Minuten. Im Verlauf der Reaktion entstand das Acyltransferprodukt PS-RH-Par10-OH, welches massenspektrometrisch eindeutig nachgewiesen werden konnte; nicht modifiziertes Edukt Strep-RH-Par10-OH bzw. das „Hydrolysezwischenprodukt“ RH-Par10-OH (11,655 kDa) konnte nach diesen weiteren 30 min Reaktionszeit nicht mehr detektiert werden (Abbildung 14 C).

5.5.3. N-TERMINALE MODIFIZIERUNG VON STREP-YRH-CYP18-OH

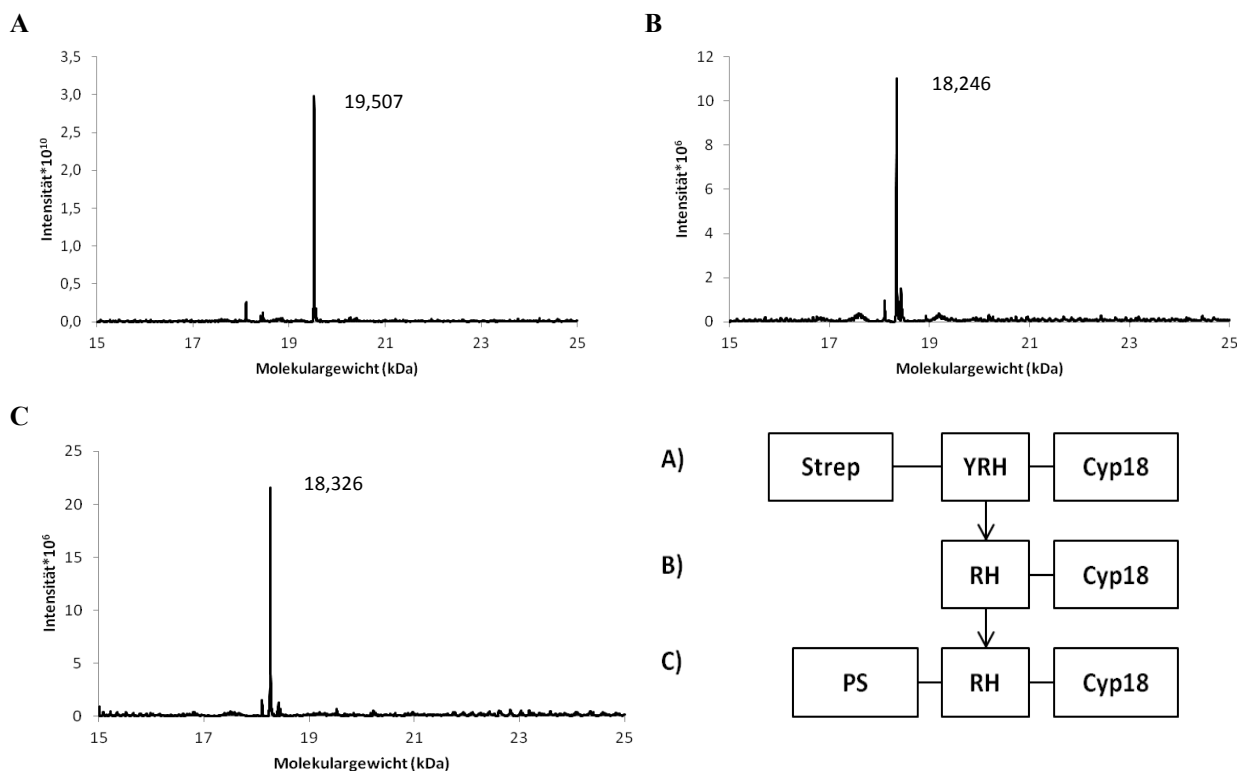


Abbildung 15. Massenspektrometrische Analyse der durch die Trypsiligase katalysierte Modifizierung von Strep-YRH-Cyclophilin18 mit PS-OGP und Norb-OGP. 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl_2 ; 50 μM ZnCl_2 ; pH 7,8; 30° C. [Cyp18]: 200 μM ; [Trypsiligase]: 10 μM ; [PS-OGP/Norb-OGP]: 1 mM. **A:** Strep-YRH-Cyp18. $\text{MW}_{\text{ber.}}$: 19,506 kDa; $\text{MW}_{\text{gef.}}$: 19,507 kDa [M+H⁺]. **B:** RH-Cyp18. $\text{MW}_{\text{ber.}}$: 18,245 kDa; $\text{MW}_{\text{gef.}}$: 18,246 kDa [M+H⁺]. **C:** PS-Cyp18 $\text{MW}_{\text{ber.}}$: 18,325 kDa; $\text{MW}_{\text{gef.}}$: 18,326 kDa [M+H⁺]. Zusätzlich gezeigt ist eine schematische Darstellung des Reaktionsfortschritts der Modifizierung A)Edukt; B)Hydrolyse; C), N-terminale Modifizierung mit Pentinsäure (PS-OGp)

Das dritte zur Modifizierung ausgewählte Protein hCyclophilin18 lag, ebenso wie die beiden anderen Zielproteine, N-terminal mit der Erkennungssequenz -YRH- modifiziert vor (19, 507 kDa; Abbildung 15 A). Durch Trypsiligase wurde RH-hCyclophilin18 nach der zweistündigen Abspaltung des Strep-Fusionspeptids (18,246 kDa; Abbildung 15 B) mit 4-Pentinsäure-OGp als Acyldonor umgesetzt (Abbildung 15 C). Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten konnte ein quantitativer Umsatz von RH-hCyp18-OH zu PS-RH-hCyp18-OH massenspektrometrisch nachgewiesen werden (18,326 kDa; Abbildung 15 C); nicht modifizierte Edukte Strep-YRH-Cyp18-OH bzw. RH-Cyp18-OH und unerwünschte Spaltprodukte wurden nicht detektiert.

In einem weiteren Ansatz wurde Strep-YRH-Cyp18-OH mit einem Norbornen-Derivat funktionalisiert. Als Acyldonor diente hierbei Norbornenyl-OGp. Die Acyltransferreaktion erfolgte analog der Reaktion mit 4-Pentinsäure-OGp. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit konnte

Norb-RH-CyP18-OH massenspektrometrisch eindeutig nachgewiesen werden (18,479 kDa; Abbildung 16). Weder unerwünschte Spaltprodukte noch die Edukte bzw. Zwischenprodukte Strep-YRH-CyP18-OH bzw. RH-CyP18-OH wurden detektiert.

Cyclophillin18 (hCyp18) konnte somit sowohl mit Pentinsäure als auch mit einem Norbornenderivat funktionalisiert werden. Beide Cyclophillin-Derivate (Alkin-bzw. Alken funktionalisiert) sollen in einem weiteren Schritt chemoselektiv final funktionalisiert werden (5.8.2.1.).

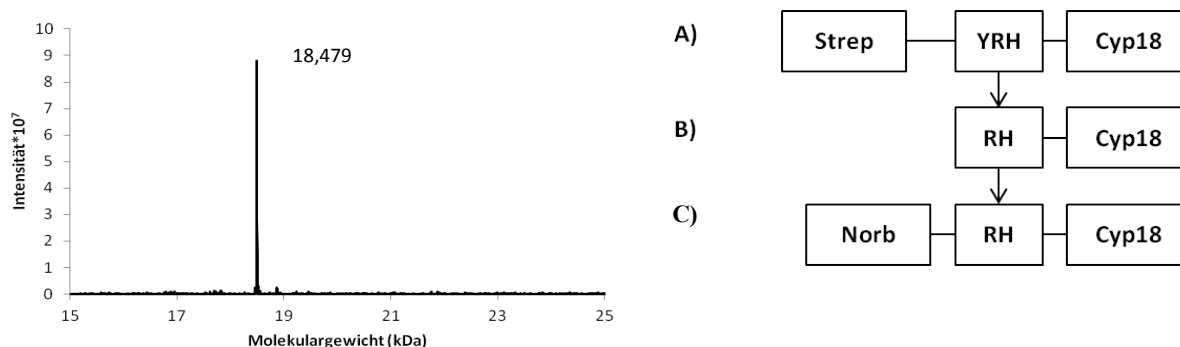


Abbildung 16. Massenspektrometrische Analyse der durch die Trypsinvariante Trypsiligase katalysierte Modifizierung von Strep-YRH-Cyclophillin18 mit PS-OGP und Norb-OGP. 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 50 μM ZnCl₂; pH 7,8; 30°C. [CyP18]: 200 μM; [Trypsiligase]: 10 μM; [Norb-OGp]: 1 mM, MW_{ber.}: 18,478 kDa; MW_{gef.}: 18,479 kDa [M+H⁺]. Zusätzlich gezeigt ist eine schematische Darstellung des Reaktionsfortgangs der Modifizierung A) Edukt; B) Hydrolyse; C) N-terminale Modifizierung mit Norbornen (Norb-OGp)

5.5.4. N-TERMINALE MODIFIZIERUNG VON YRAH-CYP18-YRHAAG-OH

Zur N-terminalen Derivatisierung des zwei Erkennungssequenzen tragenden Proteins YRAH-CyP18-YRHAAG-OH wurde 4-Pentinsäure-OGp als Acyldonor verwendet. Das Cyclophillin18 trug N-terminal die Erkennungssequenz -YRAH- für durch Trypsiligase II katalysierbare Modifizierungsreaktionen und C-terminal die Erkennungssequenz -YRH- für durch Trypsiligase-katalysierbare Modifizierungsreaktionen. Ebenso wie bei den Proteinmodellen hPin1, *E. coli* Parvulin10 und YRH-hCyclophillin18 kann auch bei dieser PPIase eine Modifizierung am N-terminalen Ende demonstriert werden (Abbildung 17).

Wie bereits in der Polyacrylamidgelelektrophorese gezeigt wurde (Abbildung 8 A) war nach zwei Stunden Reaktionszeit noch nicht proteolysiertes Strep-YRAH-CyP18-YRHAAG-OH vorhanden (20,175 kDa; Abbildung 17 B). Die Differenz zwischen dem kompletten Konstrukt und dem Spaltprodukt RAH-CyP18-YRHAAG-OH entspricht der Sequenz H-GWSHPQFEKY-OH, also dem Strep-Fusionspeptid; es fand keine Hydrolyse der zusätzlich im Proteine befindlichen YRH Sequenz statt. Abbildung 17 C zeigt das Ergebnis der Acyltransferreaktion nach einer Stunde. Hier ist zu sehen, dass sowohl das Edukt Strep-YRAH-CyP18-YRH (20,175 kDa), das Intermediat RAH-CyP18-YRH (18,915 kDa) als auch das Acyltransferprodukt PS-RAH-CyP18-YRH (18,995 kDa) im Reaktionsansatz vorhanden sind; die Reaktion ist somit nach 60 min noch nicht beendet. Die Analysezeiten wurden jedoch ähnlich wie in den vorangegangenen N-terminalen Modifizierungsreaktionen gewählt. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit mit sich anschließender chemischer Modifizierung konnte dennoch ein vollständiger Umsatz erreicht werden (siehe 5.8.2.1.).

5.6.1. C-TERMINALE MODIFIZIERUNG VON MODELLPEPTIDEN

Die bereits in den vorangegangenen Kapiteln detaillierter charakterisierten Trypsinvarianten Trypsiligase und TrypsiligaseII sollten neben Hydrolyse- und Acyltransferreaktionen unter Einsatz von sowohl Peptiden als auch Proteinen ebenso für deren C-terminale Modifizierung verwendet werden (siehe Abschnitt 4.3.2.3).

Wie in Abschnitt 5.4.2. bereits gezeigt werden konnte, stellt das Pentapeptid RAHAK(5,6CF)-OH ein effizientes Nukleophil für TrypsiligaseII dar und wurde somit im Folgenden auch als Acylakzeptor in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen für die Transamidierung mit Acyldonorpeptiden verwendet, die Histidinfunktionalitäten in P_3 oder P_4 enthalten. Hiermit sollte zum einen untersucht werden, ob und inwiefern eine weitere Verschiebung der Histidinfunktionalität von P_3 nach P_4 im Acyldonorsubstrat Auswirkungen auf die Produktausbeute hat und zum anderen inwiefern die Konzentrationsverhältnisse zwischen Acyldonor und Acylakzeptor die Produktbildung beeinflussen. Die Zeitverläufe der Produktbildung sind für Trypsiligase II und I in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

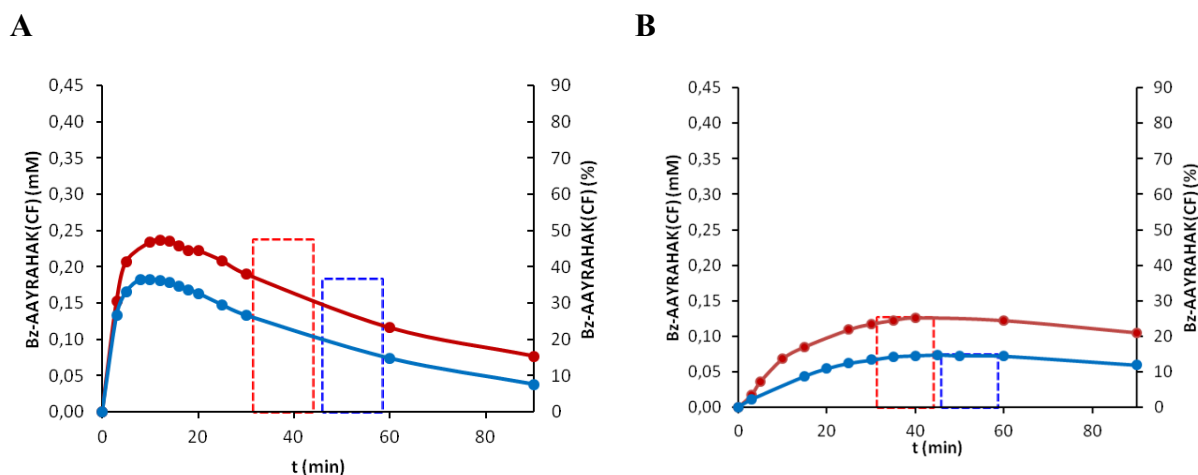


Abbildung 18. Produktbildung der durch TrypsiligaseII katalysierten Transamidierung von RAHAK(5,6CF)-OH als Acylakzeptor und Histidinhaltigen Acyldonoren. 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH 7,8; 30 °C. A: [Acylakzeptor]: 0,5 mM; [Acyldonor]: 4 mM. B: [Acylakzeptor]: 4 mM; [Acyldonor]: 0,5 mM; [TrypsiligaseII]: 10 μ M. Bz-AAAYRAHAAG-OH ● Bz-AAAYRAAHAG-OH ● Die gestrichelten Linien geben die maximal erreichte Ausbeute wieder.

Durch Variation der Verhältnisse zwischen Acyldonor und Acylakzeptor unter Verwendung der Acyldonoren Bz-AAAYRAHAAG (Abbildung 18 A) und Bz-AAAYRAAHAG-OH (Abbildung 18 B) wurden unterschiedliche Produktausbeuten erzielt (Abbildung 18 A, B). So betrug bei der höchsten Konzentration der Spaltpeptide Bz-AAAYRAHAAG und Bz-AAAYRAAHAG-OH (Acyldonor) von 4 mM (siehe Abbildung 18 A) die Syntheseausbeute an Bz-AAAYRAHAK(5,6CF)-NH₂ 0,24 mM (47% d. limitierenden Komponente¹³: Nukleophil) bzw. 0,18 mM an Bz-AAAYRAHAK(5,6CF)-NH₂ (36% d. limitierenden Komponente: Nukleophil). Bei Verwendung des Nukleophils RAHAK(5,6CF)-NH₂ im Überschuss (4 mM; Abbildung 18 B) lagen die Produktausbeuten an Bz-AAAYRAHAK(5,6CF) in einem Bereich von 0,14 mM (27% d. limitierenden Komponente: Acyldonor)

¹³ Die jeweils limitierende Komponente bezeichnet diejenige Komponente, die im Unterschuss eingesetzt wurde und somit ausbeutelimierend ist.

in Kombination mit dem Spaltpeptid Bz-AAYRAHAAG bis 0,11 mM (23% d. limitierenden Komponente: Acylonor) in Kombination mit dem Spaltpeptid Bz-AAYRAAHAG.

Bei substratsättigender Verwendung des Acylonors (Abbildung 18 A) kommt es, unabhängig von dem verwendeten Acylakzeptor, zu einem steilen Anstieg bei der Produktbildung wohingegen die sättigende Verwendung des Acylakzeptors in einem flachen initialen Anstieg der Produktbildung resultiert (Abbildung 18 B). Die Re-Proteolyse des Produkts (hinterer Teil der Kurve, Abbildung 18 A, B) verläuft hier jedoch wesentlich langsamer (ab ca. 40 min), was sich in einem geringeren Abfall der Kurve zeigt als bei substratsättigender Verwendung des Acylonors (Abbildung 18 A, ab ca. 15 min).

Bei sättigender Verwendung des Acylonors konnte zwar die beobachtete höhere Realausbeute von 47% erzielt werden, jedoch erfolgt eine recht deutliche Hydrolyse des entstandenen Produkts Bz-AAYRAHAK(5,6CF)-NH₂ (Abbildung 18A). Eine Substratsättigung der Trypsinvariante durch das Nukleophil RAHAK(5,6CF)-NH₂ (Abbildung 18 B) führte im Gegensatz dazu zu einem späteren Produktmaximum (bei ca. 40 min) und einer höheren Stabilität des entstandenen Produkts Bz-AAYRAHAK(5,6CF)-OH gegenüber einem erneuten proteolytischen Angriff (da das Transamidierungsprodukt ebenfalls die Erkennungssequenz YRAH aufweist kommt es zur erneuten Hydrolyse des Produkts, die auch als Sekundärhydrolyse bezeichnet wird; siehe Schema 2)

Für die P₂'-His-spezifische Trypsiligase wurden als Acylonor das Peptid Bz-AAYRHAAAG-OH und als Acylakzeptor das Peptid RHAK(6CF)-OH verwendet, welche bereits als spezifisch (in Bezug auf die Position der Histidinfunktionalität) für diese Trypsinvariante beschrieben wurden ^[70]. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt.

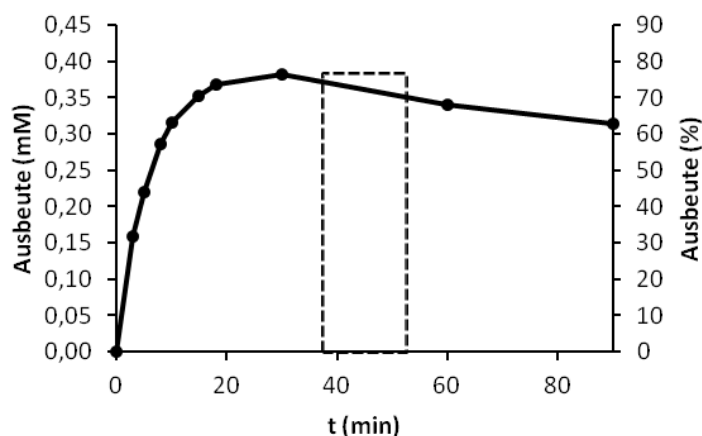


Abbildung 19. Trypsiligase-katalysierte Transamidierung von RHAAG-OH mit dem His-haltigen Peptid Bz-AAYRHAAAG-OH 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, pH 7,8; 30 °C. [RHAAG(5,6CF)]: 0,5 mM; [Bz-AAYRHAAAG-OH]: 4 mM; [Trypsiligase]: 10 μM. Die gestrichelte Linie gibt die maximal erreichte Ausbeute an.

Der Einsatz von Trypsiligase zur C-terminalen Modifizierung von His-haltigen Peptiden resultierte in einer von TrypsiligaseII abweichenden Produktausbeute (47%) bei substratsättigender Verwendung des Acylonors Bz-AAYRHAAAG-OH von 0,38 mM (76% d. limitierenden Komponente RHAAG(CF); siehe Abbildung 19). Aufgrund der signifikanten Syntheseeffizienzsteigerung wurde zur C-terminalen Modifizierung der Antikörperfragmente in nachfolgenden Experimenten (siehe 5.6.2.) ausschließlich Trypsiligase verwendet.

5.6.2. C-TERMINALE MODIFIZIERUNG DES F_{ab} -ANTI-HER2-FRAGMENTS MIT TETRAZIN

Zur C-terminalen Modifizierung wurde das F_{ab} -Fragment des Antikörpers Anti-Her2 mit der C-terminalen Erkennungssequenz **-YRH-** für die Trypsiligase und einem C-terminalen Strep-Fusionspeptid verwendet. Als Acylakzeptor diente gemäß der Enzymspezifität das Modellpeptid **RHAAC(Tetrazin)**.

Die nach der enzymatischen Modifizierung gefundenen Produkte (Abbildung 20) entsprechen dem ursprünglich eingesetzten Edukt F_{ab} -YRH-Strep ($MW_{gef.}$: 49,423 kDa), dem F_{ab} -Fragment ohne Strep-Fusionspeptid ($MW_{gef.}$: 47,891 kDa) und dem mit dem gewünschten Peptid modifizierten Produkt F_{ab} -YRHAAC(Tetrazin) ($MW_{gef.}$: 48,753 kDa). Des Weiteren lässt sich aus der massenspektrometrischen Analyse entnehmen, dass sowohl die proteolytische Abspaltung des Strep-Fusionspeptides als auch die Transamidierungsreaktion nicht quantitativ verlaufen, da sowohl das Edukt F_{ab} -AntiHer2-Strep als auch das Hydrolyseprodukt F_{ab} -AntiHer2-Y noch im Reaktionsansatz vorhanden sind (Abbildung 20). Nebenprodukte traten hierbei nicht auf; die Modifikation erfolgt ausschließlich (selektiv) innerhalb der vorgesehenen Sequenz **-YRH-**.

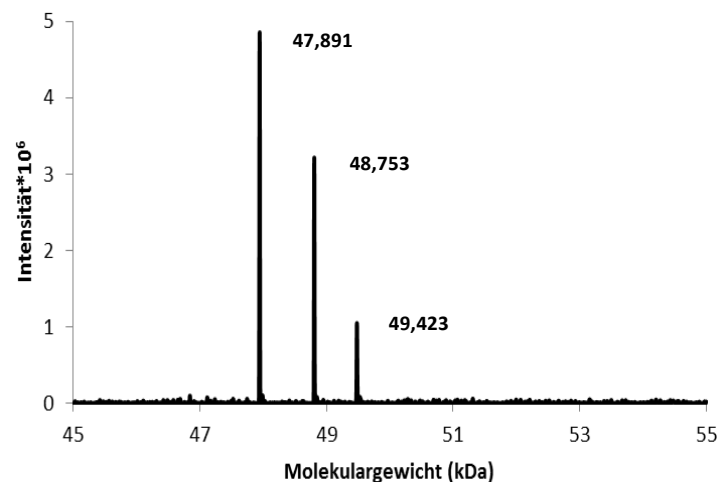


Abbildung 20. Massenspektrometrische Analyse des Transamidierungsproduktes F_{ab} -Anti-Her2-YRHAAC(Tetrazin)-OH. 100 mM HEPES-Puffer, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 100 μ M $ZnCl_2$, pH: 7,8; 30 °C, 20 Minuten Reaktionszeit. [F_{ab} -YRH-Strep]: 100 μ M; [Trypsiligase]: 10 μ M; [RHAAC(Tetrazin)-OH]: 1 mM. F_{ab} -YRH-Strep: $MW_{ber.}$: 49,422 kDa, $MW_{gef.}$: 49,423 kDa [$M+H^+$]; F_{ab} -Y $MW_{ber.}$: 47,890 kDa, $MW_{gef.}$: 47,891 kDa [$M+H^+$]; F_{ab} -YRHAAC(Tetrazin) $MW_{ber.}$: 48,752 Da, $MW_{gef.}$: 48,753 kDa [$M+H^+$]

Im Weiteren sollte F_{ab} -Anti-Her2 im Anschluss an die Modifizierungsreaktion chromatographisch aufgereinigt werden (Abbildung 21). Zur Aufreinigung des modifizierten Fragments wurde hydrophobe Interaktions Chromatographie (HIC) verwendet. Als Antikörperkonstrukt wurde in diesem Fall F_{ab} -Anti-Her2-YRH-Myc und RHAC(Tetrazin)-OH aus Gründen einer im Vergleich zu F_{ab} -Anti-Her2-YRH-Strep und RHAAC(Tetrazin)-OH günstigeren Retention des Modifizierungsproduktes verwendet. Die Reaktionsbedingungen aus der Modifikation von F_{ab} -Anti-Her2-YRH-Strep wurden ansonsten übernommen.

Abbildung 21 A zeigt F_{ab} -AntiHer2-YRHAC(Tetrazin)-OH bevor (--) und nachdem es aufgereinigt und entsalzt wurde (--). Die Reaktion von F_{ab} -AntiHer2-Myc mit dem Nukleophil RHAC(Tetrazin)-OH zeigt nach Integration des Produktpeaks bei ca. 9,3 min eine Ausbeute von ca. 70%. Das Ligationsprodukt F_{ab} -AntiHer2-YRHAC(Tetrazin)-OH konnte ebenfalls massenspektrometrisch

bestätigt werden (Abbildung 21 B; 48,695 kDa). Trotz der Entsalzung konnten Sulfataddukte des Produkts nachgewiesen werden.

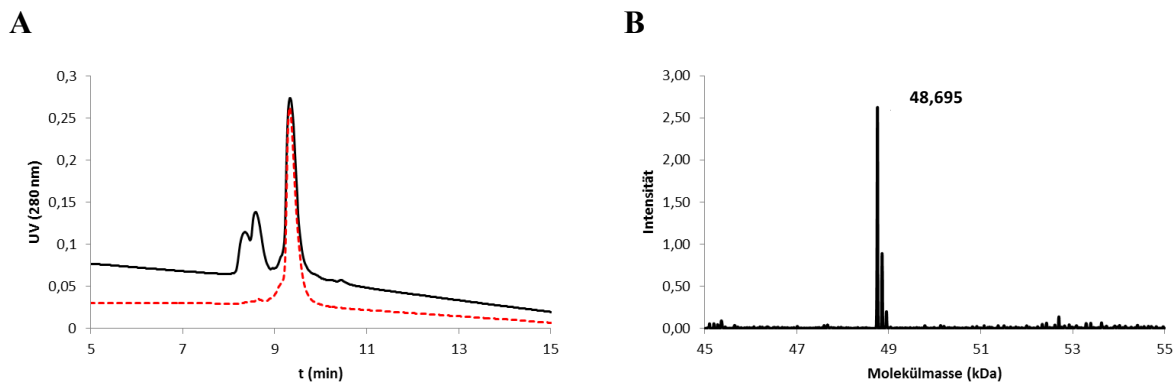


Abbildung 21. Analyse des Transamidierungsproduktes F_{ab} -Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH. **A:** Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) des Reaktionsansatzes nach 20 min – und nach der Aufreinigung --. [F_{ab} -YRH-Myc]: 100 μ M; [Trypsiligase]: 10 μ M; [RHAC(Tetrazin)-OH]: 1 mM; TSK-Gel Butyl-NPR, A: 1.5 M Ammoniumsulfat/0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5, B: 0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5; 0-2min 100% A, 2-15 min 100% A-100% B. **B:** Massenspektrometrische Analyse von F_{ab} -AntiHer2-YRHAC(Tet)-OH; $MW_{ber.}$: 48,694 kDa, $MW_{gef.}$: 48,695 kDa [$M+H^+$]; $MW_{gef.}$: 48,791 kDa ($+SO_4^{2-}$) [$M+H^+$]; $MW_{gef.}$: 48,887 kDa ($+2SO_4^{2-}$) [$M+H^+$] Reaktionsbedingungen: 100 mM HEPES-Puffer, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 100 μ M $ZnCl_2$, pH: 7,8; 30 °C, 20 Minuten Inkubation.

5.6.3. C-TERMINALE MODIFIZIERUNG DES F_{AB} -ANTI-TNF α -FRAGMENTS

In einem weiteren Beispiel zur C-terminalen Modifizierung von Antikörperfragmenten wurde Anti-TNF α mit der C-terminalen Erkennungssequenz -YRH- für die Trypsiligase und einer Strep-Fusion ebenfalls mit dem Peptid RHAAC(Tetrazin) konjugiert. Hierzu wurde das modifizierte Peptid RHAAC(Tetrazin) gemeinsam mit dem F_{ab} -Anti-TNF α -YRH-Strep Fragment und der Trypsiligase inkubiert. Die Reaktionsbedingungen aus Abschnitt 5.6.2. wurden vollständig übernommen.

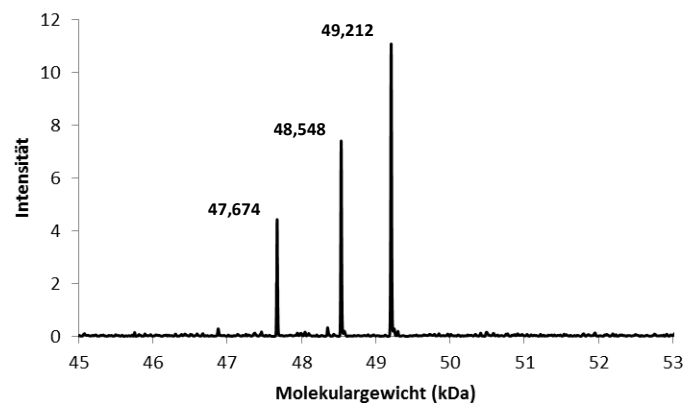


Abbildung 22. Massenspektrometrische Analyse des Transamidierungsproduktes F_{ab} -Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin)-OH. 100 mM HEPES-Puffer, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 100 μ M $ZnCl_2$, pH: 7,8; 30 °C, 20 Minuten Inkubation. [F_{ab} -YRH-Strep]: 100 μ M; [Trypsiligase]: 10 μ M; [RHAAC(Tetrazin)-OH]: 1 mM. F_{ab} -YRH-Strep: $MW_{ber.}$: 49,211 kDa, $MW_{gef.}$: 49,212 kDa [$M+H^+$]; F_{ab} -Y $MW_{ber.}$: 47,673 kDa, $MW_{gef.}$: 47,674 kDa [$M+H^+$]; F_{ab} -YRHAAC(Tetrazin) $MW_{ber.}$: 48,547 Da, $MW_{gef.}$: 48,548 kDa [$M+H^+$].

Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten bei 30 °C konnten die Reaktionsprodukte F_{ab} -Anti-TNF α -Y-OH (47,674 kDa), Das Produkt F_{ab} -Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin)-OH (48,548 kDa) und das Edukt

F_{ab}-TNF α -YRH-Strep (49,212 kDa) massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 22). Chromatographisch konnte das Produkt (F_{ab}-Anti-TNF α -RHAAC(Tetrazin)-OH) nicht von dem Edukt F_{ab}-Anti-TNF α -YRH-Myc getrennt werden (nicht gezeigt); aus diesem Grund ist auch keine genaue Angabe der Ausbeute möglich. Nebenprodukte wurden nicht gefunden.

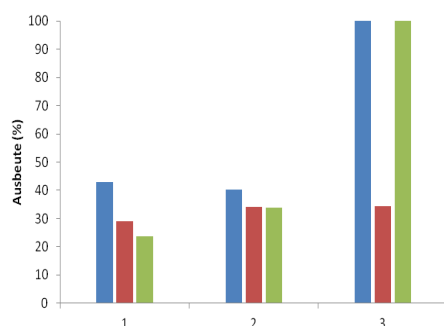
5.7. CHEMISCHE MODIFIKATION ENZYMATISCH EINGEFÜHRTER ANKER

Zur weiteren, enzymunabhängigen chemischen Modifizierung von Proteinen wurden Reaktionen entwickelt bzw. angewendet, die vollständig orthogonal zu den zu modifizierenden Proteinen sind. Sie verlaufen mit hoher Ausbeute im wässrigen Milieu und verhalten sich inert gegenüber den nukleophilen bzw. elektrophilen Funktionalitäten am Protein, so dass keinerlei Nebenreaktionen zu erwarten sind.

Zu dieser Reaktionsklasse gehören, wie bereits einleitend beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.4.) sowohl die inversen Diels-Alder Reaktionen mit Tetrazinen als Dienkomponente und Styrolen bzw. Norbornenen als Dienophilkomponente als auch die unter Kupferkatalyse durchgeführte Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen (Klick-Reaktion).

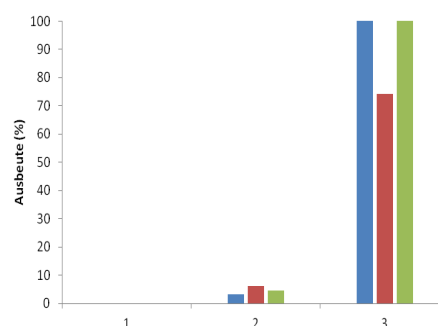
5.7.1. MODELLREAKTIONEN FÜR DIE INVERSE DIELS-ALDER REAKTION

A



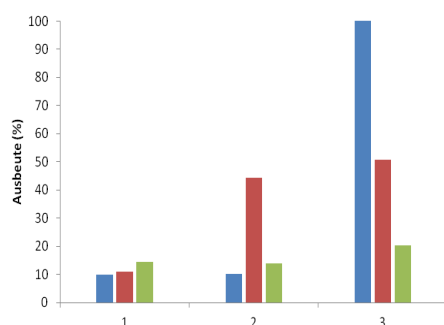
N-(2-Azidoethyl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid mit *N*-[2-Methoxyethenyl]-*N*-(propinyl)benzamid (1), 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-propinylharnstoff (2) und Norbornenyl-NBD (3)

B



4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol mit *N*-[2-Ethoxyethenyl]-*N*-(propinyl)benzamid (1), 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-propinylharnstoff (2) und Norbornenyl-NBD (3)

C



Dansyltetrazin mit *N*-[2-Ethoxyethenyl]-*N*-(propinyl)benzamid (1), 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-propinylharnstoff (2) und Norbornenyl-NBD (3)

Abbildung 23. Abhängigkeit der Umsatzeffizienz der Diels-Alder Reaktionen von den Dien:Dienophil-Konzentrationsverhältnissen. 20 mM HEPES, pH 7; 30 °C; 16 h. [Dien/Dienophil]: 1 mM; [Dien/Dienophil]: 0,5 mM. Dien:Dienophil 2:1 ■; Dien:Dienophil 1:2 ■; Dien:Dienophil 1:1 ■

Mit Hilfe von Modellreaktionen galt es zunächst die effizientesten Substrate sowie die optimalen Verhältnisse zwischen Dien und Dienophil zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden als Diene *N*-(2-Azidoethyl)-4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzamid (Abbildung 23A; Tabelle 5, 10), 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol (Abbildung 23 B; Tabelle 5, 6) und Dansyltetrazin (Abbildung 23 C; Tabelle 5, 9) verwendet. Als Dienophile kamen 4-[2-Methoxyethenyl]-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamid (**1**); Struktur siehe Tabelle 6, 2), 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-prop-2-yn-1-ylharnstoff (**2**; Struktur siehe Tabelle 7) und Norb-NBD (**3**; Struktur siehe Tabelle 8, 7) zum Einsatz. Die Konzentrationsverhältnisse wurden so gewählt, dass sie auch zur Modifizierung der enzymatisch derivatisierten Proteine verwendet werden können (siehe Abschnitt 5.5.) und lagen bei 0,5 mM und 1 mM.

Die in Abbildung 23 dargestellten Modellreaktionen dienten der Auswahl des optimalen Paares aus Dien und Dienophil zur Erreichung einer maximalen Produktausbeute. Unberücksichtigt blieben hierbei kinetische Aspekte der Cycloadditionsreaktion, da ausschließlich die Syntheseeffizienz nach Erreichen des Endpunktes nach 16 Stunden analysiert wurde. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich jeweils auf die in der Reaktionslösung vorhandene limitierende Komponente. Einer genauen Analyse von Abbildung 23 ist zu entnehmen, dass die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse an Dien und Dienophil die Produktausbeute beeinflussen. Des Weiteren werden unterschiedliche Produktausbeuten in Abhängigkeit von dem verwendeten Dien (Tetrazinderivat) und dem Dienophil erreicht. So ist generell erkennbar, dass der Einsatz der Dienophile *N*-[2-Ethoxyethenyl]-*N*-(propinyl)benzamid (**1**) und 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-propinylharnstoff (**2**) (Abbildung 23) zu geringeren Produktausbeuten führte als der des Norbornenderivats (siehe **3**; Abbildung 23), welches bei Verwendung eines Überschusses an Dien im Falle aller Tetrazinderivate in einem quantitativen Umsatz resultierte. Somit sind alle getesteten Tetrazinderivate zur Cycloaddition mit Norbornenderivaten geeignet und können zur Modifikation von Proteinen verwendet werden.

5.7.2. MODELLREAKTIONEN FÜR DIE KUPFERKATALYSIERTE KLICK REAKTION

Analog der Modellreaktionen für die Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf wurden Modellreaktionen für die kupferkatalysierte Klick Reaktion zwischen terminalen Alkinen und Aziden bezüglich des zu verwendenden Reduktionsmittels durchgeführt. Zum Einsatz kamen die Reduktionsmittel TCEP, Na-Ascorbat, Glutathion (reduziert) und KI (Tabelle 11). Bei TCEP und Na-Ascorbat handelt es sich um in der Klick-Reaktion häufig verwendete Reduktionsmittel. Da es sich bei TCEP um ein Phosphin handelt, besteht prinzipiell die Möglichkeit der Reaktion mit Azidderivaten^[75, 76]. KI¹⁴ ist im Zusammenhang mit CuSO₄ aufgrund des niedrigeren Elektrodenpotentials ebenfalls ein gutes Reduktionsmittel, welches jedoch durch die Übertragung von 2 Elektronen zur Bildung von metallischem Kupfer führen könnte. Es könnte jedoch zur Erhaltung des reduzierten Zustands von Na-Ascorbat eingesetzt werden. THPTA dient der Stabilisierung der Cu(I)-Spezies und wird daher in nahezu allen Reaktionsansätzen verwendet. Aminoguanidin soll in Klick-Reaktionen in Gegenwart von den *N*-terminal modifizierten Proteinen mit den aus der Reduktion von Cu(II) resultierenden Ascorbinsäurederivate reagieren und somit die zu modifizierenden Proteine schützen. Als Azidokomponente wurde Dansylazid verwendet. Die Alkin Komponente war 2-Propin-1-ol. Die Modellreaktion wurde bei 25 °C durchgeführt. In Tabelle 11 werden die Ergebnisse zusammengefasst.

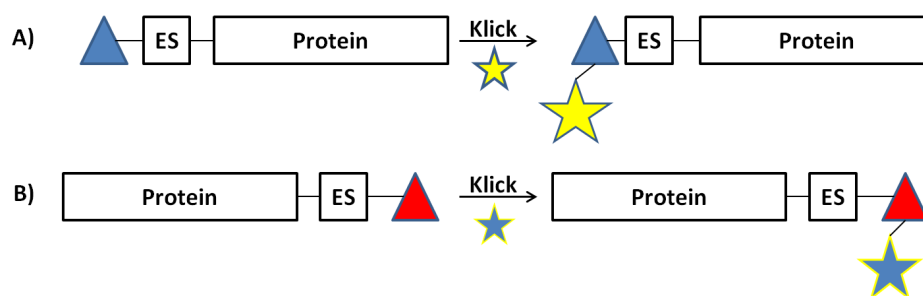
¹⁴ 2KI + CuSO₄ -> I₂ + Cu + K₂SO₄

Tabelle 11. Produktbildung in Abhängigkeit vom verwendeten Reduktionsmittel bei der Cu(I)-katalysierten Huisgen-Cycloaddition. 0,1 M HEPES-Puffer, 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 µM ZnCl₂, pH: 7,8; 30 °C, 60 Minuten Inkubation; 25 °C. [Dansylethylazid]: 2 mM; [2-Pent-1-ol]: 1 mM

Nr.	CuSO ₄ (mM)	THPTA (mM)	Ascorbat (mM)	TCEP (mM)	Aminoguanidin (mM)	KI (mM)	GSH (mM)	Produkt
1	0,5	2,5	25	//	25	//	//	++
2	0,5	2,5	//	//	25	//	25	--
3	0,5	2,5	//	25	25	//	//	--
4	0,5	2,5	//	//	25	25	//	--

Tabelle 11 zeigt, dass weder das Peptid Glutathion, das Phosphin TCEP noch das anorganische Salz KI im Zuge der kupferkatalysierten Huisgen Klick-Reaktion zu Reduktionszwecken Verwendung finden können. Ein Cycloadditionsprodukt im Rahmen der regioselektiven Cycloadditionsreaktion entsteht ausschließlich bei Verwendung von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel.

5.8. CHEMISCHE MODIFIZIERUNGEN



Schema 6. Chemische Modifizierung der enzymatisch modifizierten Proteine am N-Terminus (A) und am C-Terminus (B). ES: Erkennungssequenz

In einem finalen Schritt sollten die in Abschnitt 5.5. und 5.6. genannten enzymatisch *N*- und *C*-terminal modifizierten Proteine mit einer weiteren, davon unabhängigen Modifizierung versehen werden. Wie in Schema 6 (A, B) dargestellt, galt es diese Modifizierung mittels „Klick“-Reaktion einzuführen (siehe 1.2.4.2. 1,3-dipolare Cycloadditionen). Die am *N*-Terminus enzymatisch mit 4-Pentinsäure modifizierten Proteine PS-RH-*h*Pin1-OH, *E.coli* PS-RH-Parvulin10-OH, PS-YRH-Cyclophilin18-OH und PS-YRAH-Cyclophilin18-YRHAAG-OH (siehe Abschn. 5.5.1.-5.5.4.) sowie die beiden Peptide RAHAK(5,6CF)-NH₂ und RHAK(6CF)-OH (siehe Abschn. 5.4.2.) sollten mittels der kupferkatalysierten Huisgen Cycloaddition mit Dansylazid (Tabelle 8, 4) modifiziert werden. Das *C*-terminal enzymatisch modifizierte F_{ab}-Fragment Anti-Her2 (siehe Abschn. 5.6.2.) sollte mittels der Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf mit Norb-NBD (Tabelle 8, 7) als dienophiler Komponente modifiziert werden.

5.8.1. KLICK-REAKTION AN ENZYMATISCH MODIFIZIERTEN MODELLPEPTIDEN

Die Modellpeptide PS-RHAK(6CF)-OH und PS-RAHAK(5,6CF)-NH₂ wurden in Lösung mit Dansylazid modifiziert. Dazu wurde die Azidkomponente der Reaktionslösung in zweifachem Überschuss zugegeben. Zusätzlich erfolgte aufgrund der begrenzten Wasserlöslichkeit des Azids und

des Liganden TBTA die Zugabe von DMF als Kosolvens bis zu einer Endkonzentration von 50% (v/v). Cu(I) diente der Katalyse der Cycloaddition („Klick-Reaktion“) und wurde *in situ* durch Ascorbinsäure aus CuSO_4 erzeugt. TBTA wurde zur Stabilisierung der Cu(I)-Spezies zugegeben. Die Reaktionszeit zwischen den peptidischen Komponenten PS-RHAK(6CF)-OH bzw. PS-RAHAK(5,6CF)- NH_2 und Dansylazid betrug unter den gewählten Reaktionsbedingungen 30 Minuten. Die Ausbeute an dansyliertem PS-RHAK(6CF)-OH (Abbildung 24 A) bzw. PS-RAHAK-NH₂ (Abbildung 24 C) betrug 99%.

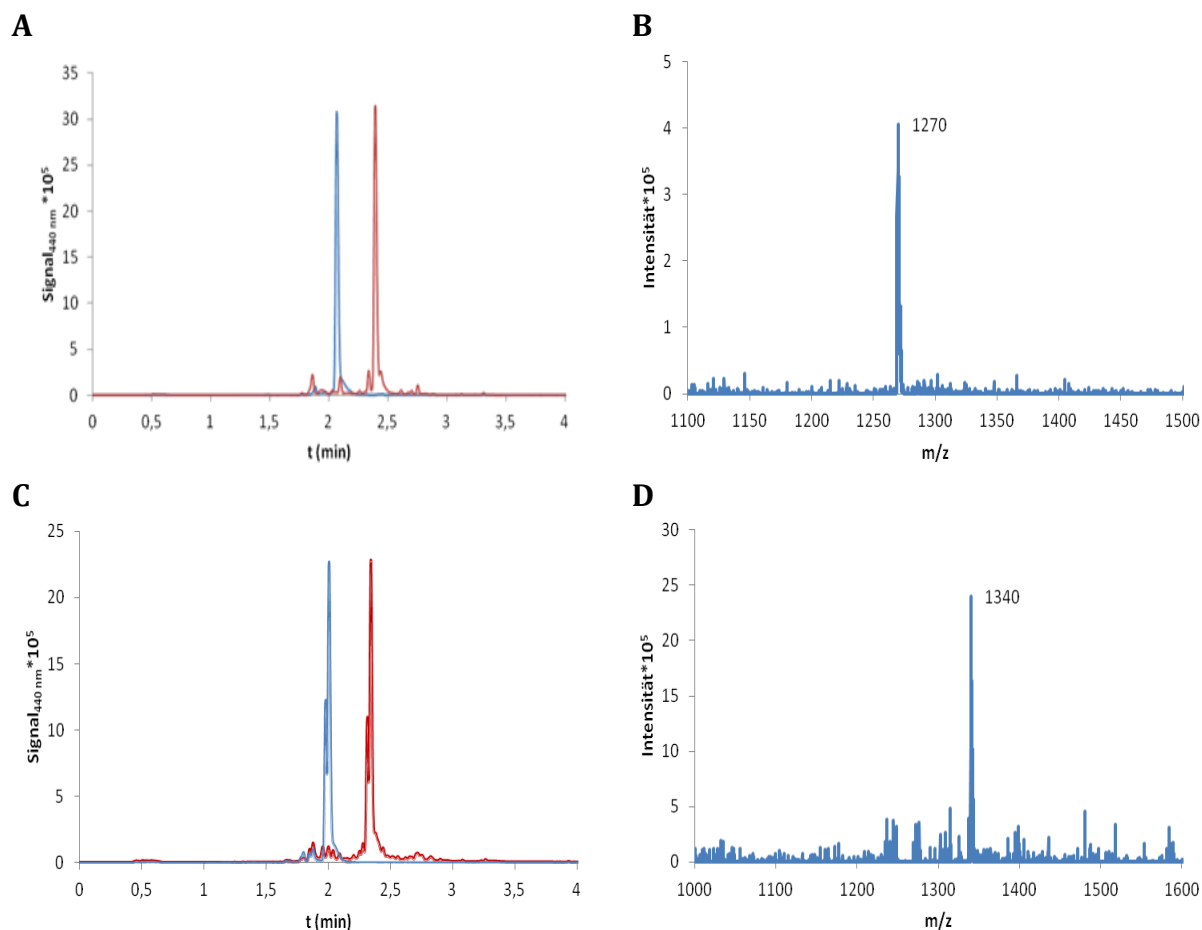


Abbildung 24. Chromatographische und massenspektrometrische Analyse der Klick-Reaktionen mit Dansylazid der N-terminal modifizierten Modellpeptide PS-RHAK(6CF) und PS-RAHAK(5,6CF) A,C: HPLC-Chromatogramm und massenspektrometrische Analyse der Klick-Reaktion zwischen PS-RHAK(6CF) und Dansylazid; PS-RHAK(6CF)-OH $m/z_{\text{ber.}}$: 1269, $m/z_{\text{gef.}}$: 1270 $[\text{M}+\text{H}^+]$. B,D: Chromatogramm und massenspektrometrische Analyse der Klick-Reaktion zwischen PS-RAHAK(5,6CF) und Dansylazid. PS-RAHAK(5,6CF) $m/z_{\text{ber.}}$: 1339, $m/z_{\text{gef.}}$: 1340 $[\text{M}+\text{H}^+]$. Reaktionsbedingungen: 0,1 M HEPES 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , pH 7,8; 30 °C; 30 min [Peptid]: 1 mM; [Dansylazid]: 2 mM; [TBTA]: 2,5 mM $[\text{CuSO}_4]$: 0,5 mM; [Na-Ascorbat]: 25 mM; [DMF/DMSO]: 7% (v/v). Edukt (-); Produkt (-).

Zur „Klick-chemischen“ Modifizierung von Proteinen kann diese Methode jedoch nicht uneingeschränkt verwendet werden, da der hohe Anteil an organischem Lösungsmittel (DMF) zur Denaturierung und somit zur Präzipitation empfindlicher Proteine führen kann. Die Verwendung eines wasserlöslichen (Cu-)Liganden wie THPTA oder die Modifizierung des Proteins an einem immobilisierten Liganden wie Nitrilotriessigsäure stellen eine attraktive Alternative dar. Ein ebenfalls nützlicher Nebeneffekt dieser Methode wäre die Tatsache, dass nach der Reaktion kupferfreie Proteine erhalten werden könnten.

5.8.2. CHEMISCHE MODIFIZIERUNG DES N-TERMINAL EINGEFÜHRTEN ANKERS

Zur chemischen Modifizierung der eingeführten „Alkin-Anker“ wurden unterschiedliche Methoden verwendet. Zum einen wurde eine Klick-Reaktion in Lösung durchgeführt. Dabei wurden alle erforderlichen Komponenten, wie im Methodenteil bereits beschrieben (siehe Abschn. 4.4.2.1.), in einem Puffer gelöst. Aus Gründen der besseren Wasserlöslichkeit wurde THPTA als Cu(I)-Ligand verwendet. Zum anderen wurde als Variante dieser „Klick-Reaktion“ die Cycloaddition an einem Nitrilotriessigsäure-Harz durchgeführt (siehe 4.4.2.2.). Die Nitrilotriessigsäure wurde mit *in situ* reduziertem Cu(I) beladen. Das Harz und das zu modifizierende Protein wurden in eine Säule gefüllt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Klick-Reaktionsansätze sowohl immobilisiert (5.8.2.1) als auch in Lösung (5.8.2.2.) wurden massenspektrometrisch analysiert (massenspektrometrische Daten der Reaktion in Lösung nicht gezeigt).

5.8.2.1. Modifizierung von *hPin1*, *hCyclophilin18* und *E. coli* Parvulin10

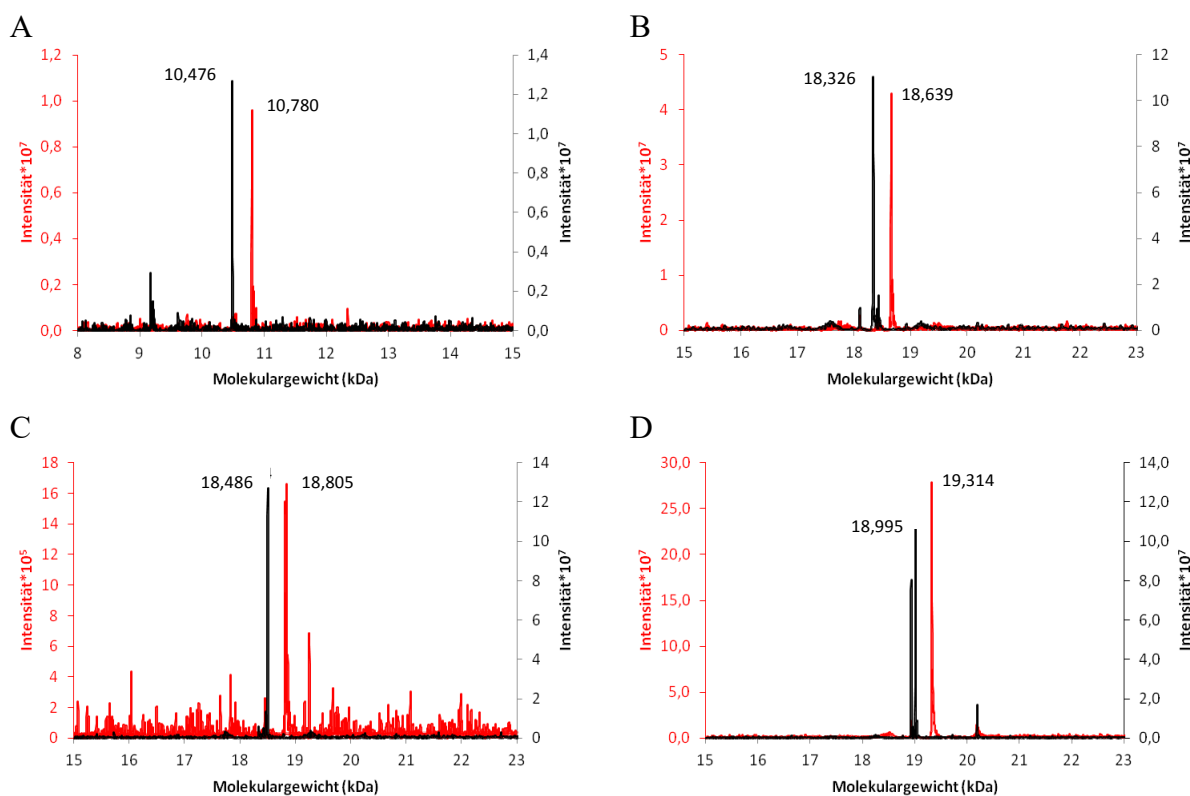


Abbildung 25. Massenspektrometrische Analyse der chemischen Proteinmodifikation am polymeren Träger. 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 50 μM ZnCl₂; pH 7,8; 30°C. [Protein]: 200 μM; [Dansylazid]¹⁵: 2mM. **A:** Dansyl-PS-Parv10 MW_{ber.}: 10,779 kDa., MW_{gef.}:10,780 kDa [M+H⁺]. **B:** Dans-PS-RH-CyP18 MW_{ber.}:18,638 kDa, MW_{gef.}: 18,639 kDa [M+H⁺]. **C:** Dans-PS-RH-Pin1 MW_{ber.}: 18,804 kDa, MW_{gef.}: 18,805 kDa [M+H⁺]. **D:** Dans-PS-RAH-CyP18-YRHAAG MW_{ber.}: 19,313 kDa, MW_{gef.}: 19,314 kDa [M+H⁺]. (-): vor der Klick-Reaktion; (-): nach der Klick-Reaktion.

Wie in Schema 6 bereits dargestellt ist, sollte die enzymatisch eingebrachte, am N-Terminus des jeweiligen Proteins gelegene 4-Pentinsäure (siehe 5.5.1.-5.5.4.) in einem chemischen Schritt mittels Klick-Reaktion final weiter funktionalisiert werden. Als Dien diente hierbei das fluoreszenzaktive

¹⁵ da Pentinsäure-OGp in einer Konzentration von 1 mM verwendet wurde und der Reaktionsansatz ohne weitere Reinigung für die Klick-Reaktion verwendet wurde (Eintopfreaktion), musste eine entsprechend hohe Konzentration an Dansylazid zur vollständigen Modifizierung eingesetzt werden

Dansylazid. Für die Klick-Reaktion wurde ein zweifacher Überschuss der Azidkomponente Dansylazid verwendet.

Nach dem Entfernen von ungebundenem Cu(I) mit einer wässrigen Aminoguanidinlösung konnte das zu modifizierende Protein auf die Matrix gegeben werden. Die Klick-Reaktion wurde durch die Zugabe von Dansylazid (Stammlösung in DMF) gestartet. Nach ein bis zwei Stunden wurde die Additionsreaktion durch Abzentrifugieren des polymeren Materials beendet. Der Überstand wurde massenspektrometrisch analysiert. Die korrespondierenden Spektren sind in Abbildung 25 dargestellt.

Abbildung 25A- 25D zeigen die massenspektrometrische Analyse bevor (schwarz) und nachdem (rot) Dansylethylazid mit den entsprechenden Klick-Reagentien CuSO₄, THPTA und Ascorbinsäure dem Reaktionsansatz zugegeben wurden. Die Differenz von 320 Da entspricht jeweils exakt der von Dansylazid (M+H⁺: 320). In Abbildung 25 D (Dans-PS-RAH-Cyp18-YRH) ist immer noch das nicht proteolytisierte Strep-YRAH-CyP18-YRH nachweisbar (20,1 kDa).

5.8.2.2. Klick-Reaktion am Protein in Lösung

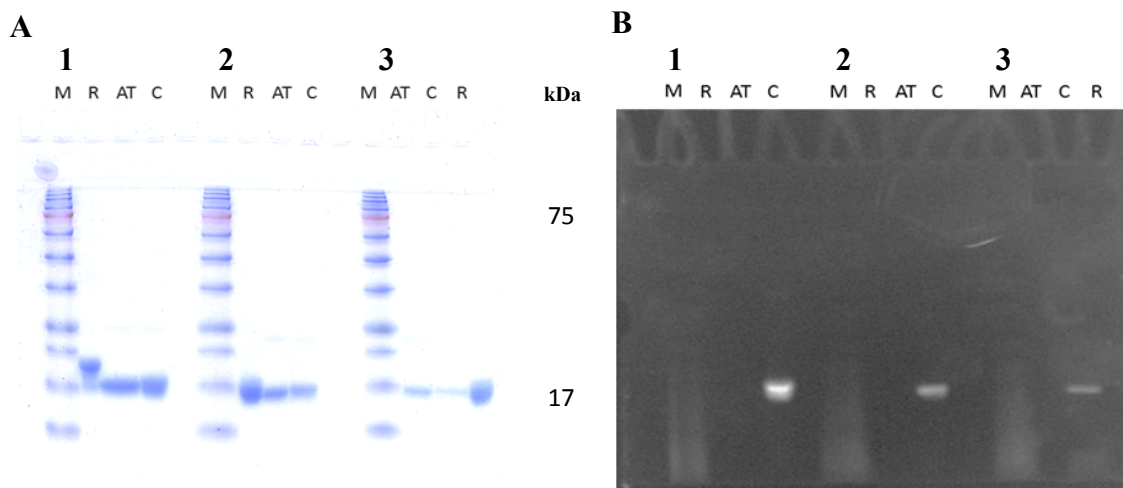


Abbildung 26. Gelelektrophorese (PAGE) der enzymatisch und chemisch modifizierten Proteine. [Protein]: 100 μ M; [PS-OGp]: 1 mM [Dansylazid]¹⁶: 2 mM; [CuSO₄]: 0,5 mM μ M; [Aminoguanidin]: 25 mM; [THPTA]: 2,5 mM [Na-Ascorbat]: 25 mM. **A:** Coomassie-Färbung. **B:** Fluoreszenz **1:** Strep-YRH-CyP18. **2:** Strep-YRH-Pin1. **3:** Strep-YRAH-CyP18. M: Molekulargewichtsstandard; R: Referenz (Protein mit Strep-Fusion); AT: Protein nach Spaltung der Strep-Fusion und Acyltransferreaktion mit PS-OGp; C: Klick-Reaktion mit Dansylazid nach 1,5 h.

Wie bei der trägergestützten Klick-Reaktion wurde auch bei der Klick-Reaktion in Lösung Dansylazid als Dienkomponente gewählt. Der Kupferkatalysator wurde bei der Reaktion in Lösung nach Reduktion mit THPTA zur Stabilisierung komplexiert. Die Mischung der Reaktionskomponenten erfolgt hierbei nicht in zufälliger Reihenfolge/Abfolge. Aufgrund der großen Redox-Aktivität von Cu(I)-Spezies wird das verwendete CuSO₄ ausschließlich in Gegenwart des Liganden durch Na-Ascorbat reduziert. Die Verwendung von Aminoguanidin soll das Auftreten von reaktiven Derivaten der Ascorbinsäure verhindern, die zu einer kovalenten Modifikation von Proteinen führen könnten^[120]. Die Klick-Reaktion selbst wurde durch Zugabe von Na-Ascorbat gestartet und für 1,5 Stunden bei 4 °C inkubiert. Das dansylfunktionalisierte Zielprotein wurde mittels Fluoreszenz durch

¹⁶ da Pentinsäure-OGp in einer Konzentration von 1 mM verwendet wurde und der Reaktionsansatz ohne weitere Reinigung für die Klick-Reaktion verwendet wurde (Eintopfreaktion), musste eine entsprechend hohe Konzentration an Dansylazid zur vollständigen Modifizierung eingesetzt werden.

Anregung des Polyacrylamidgels unter kurzwelligem UV-Licht nachgewiesen (siehe Abbildung 26B, Bahn C). Abbildung 26 A und B zeigen den vollständigen Verlauf der enzymatischen und chemischen Modifizierung von RH-*h*Pin1-OH, YRH-CyP18-OH und YRAH-CyP18-YRHAAG-OH. In Abbildung 26 B ist ausschließlich das mit einer Dansylfunktionalität versehene, chemisch funktionalisierte Protein zu sehen (siehe Abbildung 26 A 1-3, Bahn C), wohingegen Abbildung 26 A den gesamten Verlauf vom unmodifizierten Protein (Bahn R, Abbildung 26) über das mit 4-Pentinsäure modifizierte Protein (Bahn AT) bis hin zum dansylfunktionalisierten Protein (Bahn C, Abbildung 26) mit Hilfe eines Coomassie gefärbten Gels zeigt. Die Referenz R entspricht dem jeweiligen Eduktprotein *h*Pin1, Cyp18, Parvulin10 mit Strep-Fusionspeptid. Nach der Acyltransferreaktion AT entsteht eine neue Bande unterhalb der Referenzbande R bei ungefähr 17 kDa, welche den mit Pentinsäure funktionalisierten Proteinen entspricht. Die Veränderung des Molekulargewichts der Proteine nach der Klick-Reaktion (Bahn C, Abbildung 26) ist in der Gelelektrophorese nicht sichtbar.

5.8.2.3. Chemische Modifizierung des N-terminal eingeführten Norbornen-Ankers

Neben dem eingeführten Pentinsäure-Anker (PS) wurde YRH-CyP18 zusätzlich N-terminal im Zuge einer enzymatischen Reaktion mit einem Norbornen-Derivat modifiziert (Abbildung 16). Dieses elektronenreiche Alken reagiert im Rahmen einer inversen Diels-Alder Reaktion chemoselektiv mit Tetrazinderivaten. (siehe 1.2.4.1. Diels-Alder Reaktionen). Dieser chemische Umsatz erfolgte bioorthogonal im Anschluss an die enzymkatalysierte Modifizierungsreaktion in einer Eintopfreaktion. Eine Aufreinigung von Norb-RH-Cyp18 war nicht notwendig (Abbildung 27), da Strep-Cyp18 vollständig zu Norb-Cyp18 umgesetzt werden konnte (Abbildung 16).

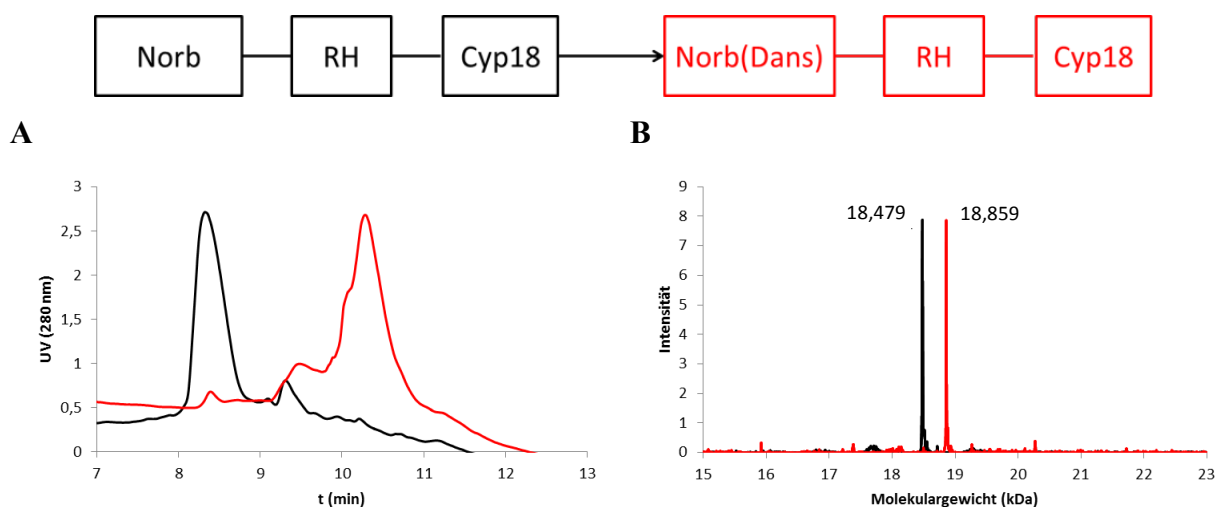


Abbildung 27. Analyse der chemischen Proteinmodifikation durch die inverse Diels-Alder Reaktion zwischen Norb-CyP18 und Dansyltetrazin. A: Hydrophobe Interaktionschromatographie von Norb-RH-Cyp18 (-) und dem „geklickten“ Produkt Norb(Dans)-RH-Cyp18 (-). TSK-Gel Butyl-NPR, A: 1.5 M Ammoniumsulfat/0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5, B: 0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5; 0-2min 100% A, 2-15 min 100% A-100% B. B: Massenspektrometrische Analyse vor der Klick-Reaktion (-) und nach der Klick-Reaktion (-); Norb-Cyp18, MW_{ber.}: 18,478 kDa; MW_{gef.}: 18,479 kDa [M+H⁺]. Norb-Dans-RH-Cyp18 MW_{ber.}: 18,858 kDa, MW_{gef.}: 18,859 kDa [M+H⁺]. Reaktionsbedingungen: 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 50 μM ZnCl₂; pH 7,8; 30°C. [Norb-RH-Cyp18]: 200 μM; [Dansyltetrazin]¹⁷: 400 μM.

¹⁷ da Norb-OGp in einer Konzentration von 1 mM verwendet wurde und die enzymatische Reaktion ohne Reinigungsschritt für die Klick-Reaktion verwendet wurde, musste eine entsprechende Menge an Dansylazid zur vollständigen Modifizierung verwendet werden

Massenspektrometrisch konnte gezeigt werden, dass Norb-RH-CyP18 mit Dansyltetrazin modifiziert vorliegt. Die gefundene Massendifferenz von 375 Dalton entspricht der des Dansyltetrazins nach der Additionsreaktion abzüglich des molekularen Stickstoffs, der während der Reaktion durch Eliminierung frei wird (Abbildung 27 B). Ebenso konnte chromatographisch gezeigt werden, dass die chemische Klick-Reaktion von Norb-RH-Cyp18 zu Dans(Norb)-RH-Cyp18 nahezu vollständig verläuft (Abbildung 27 A).

In einer weiteren Reaktion wurde das enzymatisch modifizierte Protein Norb-RH-CyP18 exemplarisch mit einem pegylierten Tetrazinderivat modifiziert. Dazu wurde nach Abschluss der Acyltransferreaktion von RH-CyP18-OH auf Norb-OGp (Tabelle 8, 9) dem Reaktionsansatz Methoxy-PEG-Tetrazinylbenzoat (Tabelle 5, 4) im Überschuss zugegeben. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Abbildung 28).

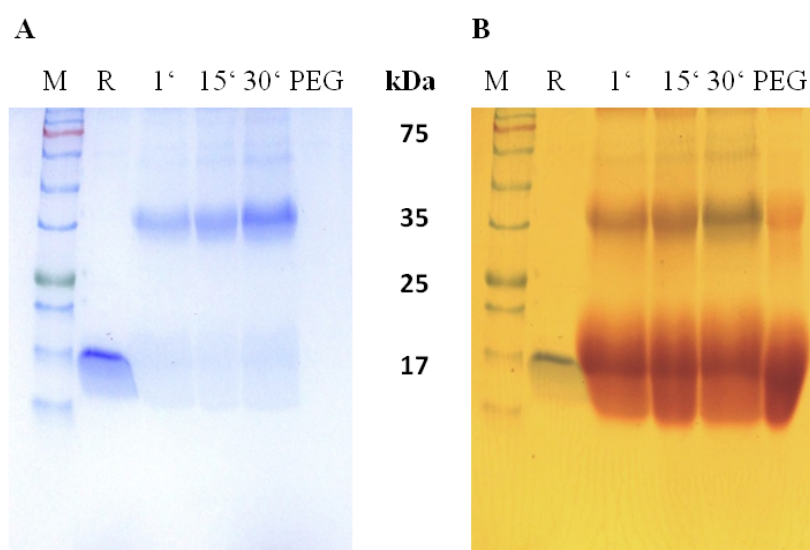


Abbildung 28. Gelelektrophoretische Analyse des Zeitverlaufs der N-terminalen Modifikation von Norb-RH-CyP18 mit Methoxy-PEG-Benzoyltetrazin. A: Coomassiefärbung des Gels. B: Iodfärbung desselben Gels. M: Molekulargewichtsstandard; R: Norb-RH-CyP18. 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 50 µM ZnCl₂; pH 7,8; 30 °C. [Norb-RH-CyP18]: 100 µM; [Methoxy-PEG-Tetrazinylbenzoat]: 0,5 mM.

Abbildung 28 zeigt den zeitlichen Verlauf der chemischen Modifikation von Norb-RH-CyP18 mit Methoxy-PEG-Tetrazinylbenzoat nach 1 min, 15 min und 30 min, wobei zu erkennen ist, dass die Proteinbande bei 35 kDa nach 30 min am intensivsten angefärbt ist (Abbildung 28 A). Schon im mit Coomassie gefärbten Gel (Abbildung 28 A) ist sehr deutlich zu sehen, dass die Pegylierung von Norb-Cyp18 mit dem 10 kDa großen PEG Derivat zu einer Verschiebung um ungefähr 18 kDa im SDS-Gel führt. Abbildung 28 B ist eine Iodfärbung desselben SDS-Gels gezeigt. Elementares Iod besitzt die Eigenschaft, Polyethylenglycole spezifisch anzufärben; hier ist zu sehen, dass die Banden bei 35 kDa mit Iod angefärbt werden können, was zeigt, dass diese sowohl Protein als auch PEG enthalten.

5.8.3. CHEMISCHE MODIFIZIERUNG DES C-TERMINAL EINGEFÜHRTEN TETRAZINANKERS

Die enzymatisch in das Antikörperfragment F_{ab}-Anti-Her2 eingefügte Sequenz RHAAC(Tetrazin) sollte in einem chemischen Schritt (Schema 6) weiter funktionalisiert werden. Im Gegensatz zu der kupferkatalysierten „Klick-Reaktion“ werden für die inverse Diels-Alder Reaktion

(1.2.2.3. und 4.4.3.) weder Katalysator noch Ligand benötigt. Die Modifizierung erfolgte durch Reaktion mit Norb-NBD.

5.8.3.1. Modifizierung von F_{ab}-Anti Her 2-YRHAAC(Tetrazin)-OH mit Norb-NBD

Bei Norbornenyl-NBD handelt es sich um ein Norbornen, welches mit einem Nitrobenzoxadiazol (NBD) derivatisiert wurde (siehe Tabelle 8, 7). Nitrobenzoxadiazole sind Fluoreszenzfarbstoffe. In Abbildung 29 zeigt eine gelelektrophoretische Analyse des Modifizierungsverlaufs von F_{ab}-Anti-Her2-YRH-Strep von der Abspaltung des Strep-Fusionspeptids (Abbildung 29 A, Bahn 2) über die Transamidierungsreaktion des Peptids RHAAC(Tetrazin)-OH (Abbildung 29 A 2-3) bis hin zur inversen Diels-Alder-Reaktion mit zwei Äquivalenten Norb-NBD zusammengefasst (Abbildung 29 A,B). Eine Aufreinigung nach der enzymatischen Reaktion fand nicht statt. Während die Gele in Abbildung 29 A mit Hilfe des proteinfärbenden Coomassiefarbstoff angefärbt wurden, erfolgte die Analyse in Abbildung 29 B fluoreszenzbasiert bei einer Wellenlänge von 320 nm.

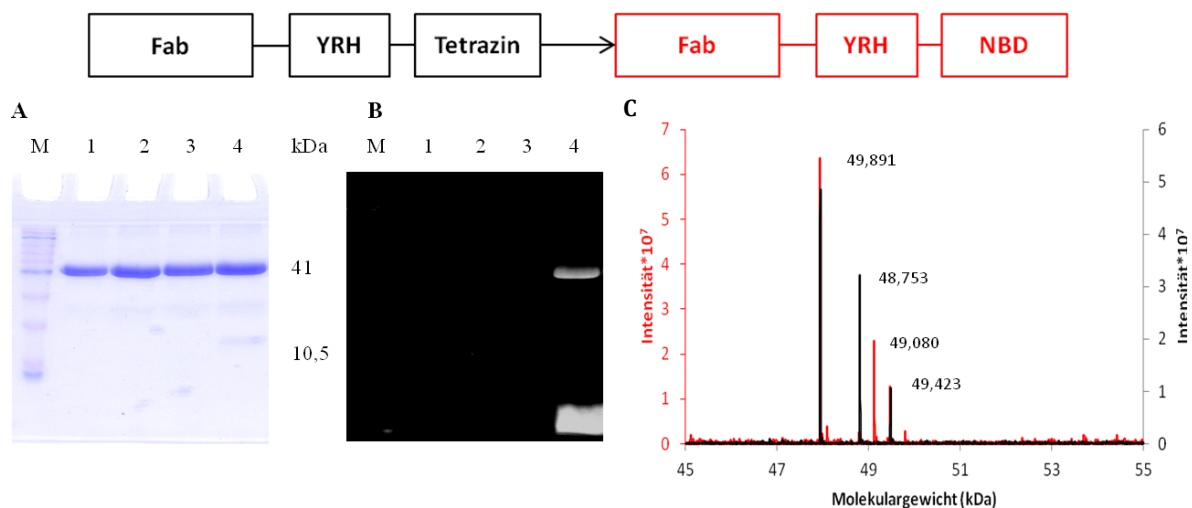


Abbildung 29. Gelelektrophoretische und massenspektrometrische Analyse der chemischen Funktionalisierung von F_{ab}-Anti-Her2-YRH-Strep mit Norb-NBD. 100 mM HEPES-Puffer, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, pH: 7,8; 30 °C. [F_{ab}-YRH-Strep]: 100 μM; [RHAAC(Tetrazin)-OH]: 1 mM; [Norb-NBD]¹⁸: 2 mM; [Trypsiligase]: 10 μM; [EDTA]¹⁹: 50 mM **A:** Polyacrylamidgelelektrophorese; Coomassie-Färbung. **B:** Polyacrylamidgelelektrophorese; Fluoreszenz-Anregung. M: Molekulargewichtsstandard GeneOn Protein Marker PS11; 1: Fab-Anti-Her2-YRH-Strep; 2: Transamidierungsreaktion mit RHAAC(Tetrazin)-OH nach 5 min; 3: Transamidierungsreaktion mit RHAAC(Tetrazin)-OH nach 15 min; 4: Diels-Alder Reaktion mit Norb-NBD nach 60 min. **C:** Massenspektrometrische Analyse des Reaktionsansatzes nach der Diels-Alder Reaktion. F_{ab}-Anti-Her2-YRH-Strep MW_{ber.}: 49,422 kDa, MW_{gef.}: 49,423 kDa; F_{ab}-Anti-Her2-Y-OH MW_{ber.}: 47,890 kDa, MW_{gef.}: 47,891 kDa [M+H⁺]; F_{ab}-Anti-Her2-YRHAAC(Tetrazin-NBD)-OH MW_{ber.}: 49,079 kDa ; MW_{gef.}: 49,080 kDa [M+H⁺]. F_{ab}-YRHAAC(Tetrazin) MW_{ber.}: 48,752 kDa, MW_{gef.}: 48,753 kDa [M+H⁺]. – enzymatische Reaktion – Klick-Rkt.

In Abbildung 29 A sind sowohl die Produkte als auch die Edukte der enzymatischen und der chemischen Reaktion sichtbar, wohingegen Abbildung 29 B ausschließlich das Produkt F_{ab}-Anti-Her2-YRHAAC(Tetrazin-NBD) sichtbar macht (Abbildung 29 B, Bahn 4). Bei 41 kDa sieht man das mit NBD modifizierte F_{ab}-Anti-Her2-Fragment, welches in Abbildung 29 A mit einer Coomassie-Färbelösung und in Abbildung 29 B durch ultraviolette Anregung des chemisch eingeführten

¹⁸ Da sich das Peptid RHAAC(Tetrazin)-OH in einer Konzentration von 1 mM in der Lösung befindet musste ein entsprechender Überschuss an Norb-NBD verwendet werden.

¹⁹ EDTA wurde verwendet, um durch Komplexbilden von Zn²⁺ die Hydrolysereaktion (Sekundärhydrolyse) der Trypsiligase zu hemmen.

Nitrobenzoxazol-Ringes (NBD) sichtbar gemacht wurde. Unterhalb von 10,5 kDa ist das zur Modifizierung verwendete Norb-NBD zu erkennen. Da es sich bei dem F_{ab}-AntiHer2 Antikörperfragment um ein 50 kDa großes Protein handelt, ist sowohl die Abspaltung des Strep-Fusionspeptids als auch die enzymatische und chemische Modifizierung (Abbildung 29 A, Bahn 1-4), anders als bei den Proteinen *hPin1 E. coli* Parv10 und *hCyclophilin18* (siehe Abbildung 26), nicht erkennbar. Im Weiteren ist in Abbildung 29 C zu erkennen, dass eine vollständige chemische Modifizierung des F_{ab}-Fragmentes durch Norb-NBD erreicht werden konnte, da F_{ab}-Anti-Her2-YRH-Tetrazin mit dem Molekulargewicht von 48,753 kDa nicht mehr nachgewiesen werden kann. Die Massendifferenz zwischen dem chemisch modifizierten Antikörperfragment und dem chemisch unmodifizierten Antikörperfragment entspricht genau dem Molekulargewicht von Norb-NBD abzüglich des in der Reaktion frei werdenden Stickstoffs.

5.8.3.2. Modifizierung von F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH mit Norb-DM1

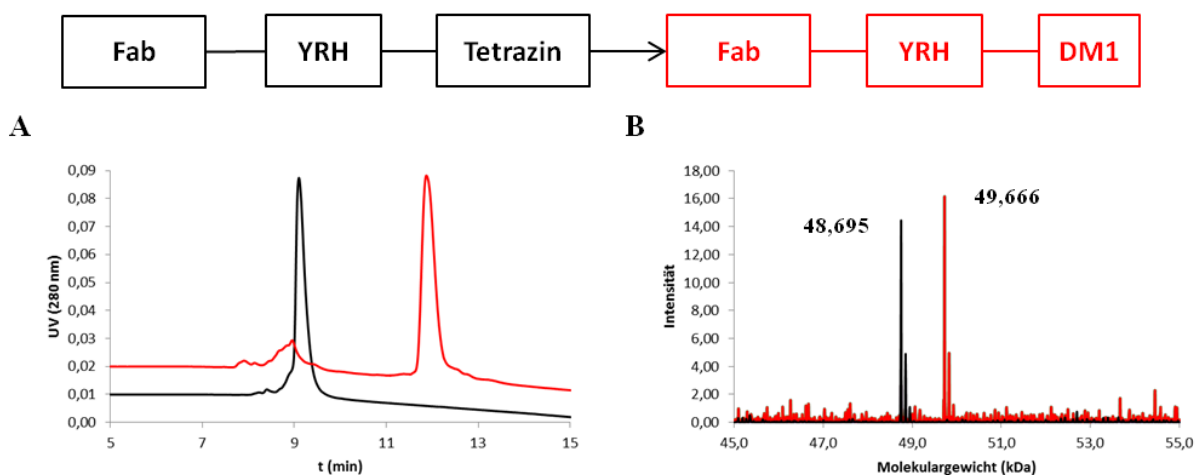


Abbildung 30. Modifizierung von F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH mit Norb-DM1. A: Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) der Modifizierungsreaktion von F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH (-) mit Norb-DM1 zu F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin-DM1)-OH (-). TSK-Gel Butyl-NPR, A: 1.5 M Ammoniumsulfat/0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5, B: 0.05 M HEPES-Puffer pH 7.5; 0-2min 100% A, 2-15 min 100% A-100% B. B: Massenspektrometrische Analyse des Reaktionsproduktes F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin-DM1)-OH. F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH, MW_{ber.}: 48,694 kDa, MW_{gef.}: 48,695 kDa; F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(DM1-Tetrazin)-OH, MW_{ber.}: 49,665 kDa, MW_{gef.}: 49,666 kDa, MW_{gef.}: 49,762 kDa (M+ SO₄²⁻); MW_{gef.}: 49,858 kDa (M+ 2* SO₄²⁻).

Bei DM1 handelt es sich um ein Maytansinoid-Derivat, welches an Tubulinstrukturen innerhalb der Zelle bindet und somit die Zellteilung eukaryotischer Zellen inhibiert. Bei DM1 handelt es sich demnach um ein Toxin, welches erfolgreich in Verbindung mit Antikörpern als sog. Antikörper-Wirkstoff-Konjugat zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt wird. Im Folgenden soll die Modifizierung von F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH mit Norb-DM1 beschrieben werden. Die chemische Modifizierung des Tetrazins verläuft vollkommen identisch mit sonstigen Tetrazin-Modifizierungen, die bereits beschrieben wurden, mit dem Unterschied, dass F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH chromatographisch isoliert wurde, bevor es mit Norb-DM1 umgesetzt wurde. Abbildung 30 zeigt sowohl chromatographisch (Abbildung 30 A) als auch massenspektrometrisch (Abbildung 30 B) die vollständige Umsetzung von F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH zu F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(DM1-Tetrazin)-OH. Ein weiterer Aufreinigungsschritt nach der chemischen Modifizierungsreaktion ist hierbei nicht notwendig.

5.8.3.3. Modifizierung von F_{ab}-Anti TNF α -YRHAAC(Tetrazin)-OH mit CF und PEG

Die chemische Modifikation von F_{ab}-Anti-TNF α -RHAAC(Tetrazin)-OH erfolgte nicht wie im vorangegangenen Beispiel mit Norb-NBD sondern mit Norb-CF, um sowohl die vielseitige Verwendbarkeit als auch den Baukastencharakter der Methode der kombinierten enzymatisch-chemischen Modifikation am Antikörperfragment zu demonstrieren. Wie im Fall des NBD handelt es sich auch bei Carboxyfluorescein um einen Fluoreszenzfarbstoff mit einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Die Abbildungen 31 A und B zeigen den Verlauf der chemischen Modifizierung nach 0 min, 5 min und 10 min. Abbildung 31 A zeigt den zeitlichen Verlauf der chemischen Modifizierungsreaktion in einem mit Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel. Aufgetragen wurden die Proben der modifizierten F_{ab}-Fragmente ohne Verwendung eines Reduktionsmittels (- Red) und nach vorheriger Reduktion mit dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (+ Red). Zu sehen sind Banden auf zunächst gleicher Höhe bei ca. 48 kDa, die sich nach Reduktion der Disulfidverbrückten schweren und leichten Kette auf ca. 25 kDa verschiebt; dies entspricht der leichten und schweren Kette des Fab-Fragments.

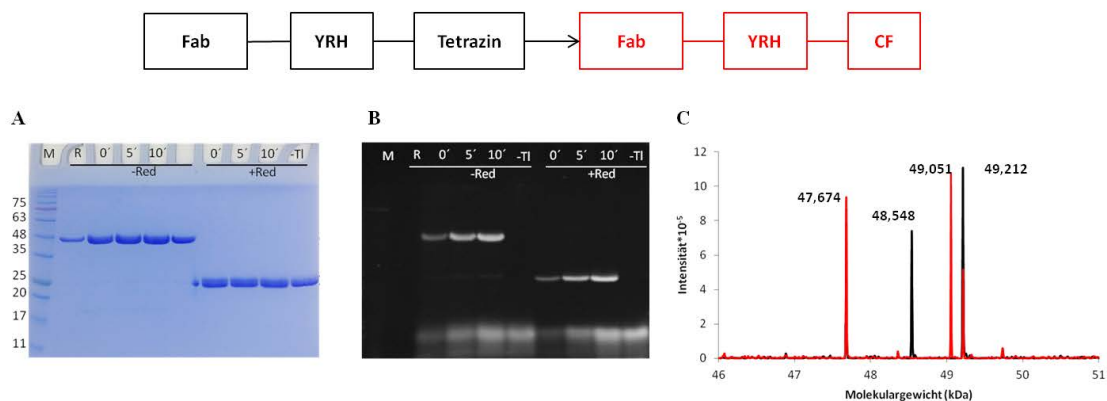


Abbildung 31. Gelelektrophoretische und massenspektrometrische Analyse der Funktionalisierung von F_{ab}-Anti-TNF α -YRH-Strep mit Norb-CF nach 0', 5' und 10' Reaktionszeit. 100 mM HEPES-Puffer, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH: 7,8; 30 °C. [F_{ab}-YRH-Strep]: 100 μ M; [RHAAC(Tetrazin)-OH]: 0,5 mM; [Norb-CF]: 1 mM; [Trypsilgase]: 10 μ M; **A:** Polyacrylamidgelelektrophorese; Coomassie-Färbung. **B:** Polyacrylamidgelelektrophorese; Fluoreszenz-Anregung, M: Molekulargewichtsstandard GeneOn Protein Marker PS11; Red: β -Mercaptoethanol, R: Referenz (F_{ab}-Anti-TNF α); -TI: Ansatz ohne Trypsilgase. **C:** Massenspektrometrische Analyse des Reaktionsansatzes nach der Diels-Alder Reaktion. F_{ab}-Anti-TNF α -YRH-Strep MW_{ber.}: 49,211 kDa, MW_{gef.}: 49,212 kDa [M+H⁺]; F_{ab}-Anti-TNF α -Y-OH MW_{ber.}: 47,673 kDa, MW_{gef.}: 47,674 kDa [M+H⁺]; F_{ab}-Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin)-OH MW_{ber.}: 48,547 kDa ; MW_{gef.}: 48,548 kDa [M+H⁺]; F_{ab}-Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin-CF)-OH MW_{ber.}: 49,050; MW_{gef.}: 49,051 kDa. [M+H⁺]. – enzymatische Rkt. – Klick-Rkt.

Im mit Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel sind schwere Kette (hc) und leichte Kette (lc) durch ihre nahezu gleiche Größe nur schwer voneinander zu unterscheiden. Abbildung 31 B zeigt das gleiche Polyacrylamidgel, welches nach UV-Anregung diejenigen Spezies zeigt, die mit Carboxyfluorescein modifiziert vorliegen. Hier ist deutlich eine Zunahme der Fluoreszenz von 0 min bis 10 min zu erkennen. Sowohl die Referenzbande (R) als auch derjenige Ansatz, ohne Verwendung des Enzyms Trypsilgase (-TI) zeigen keinerlei Fluoreszenz. Die Polyacrylamidgelelektrophorese mit Verwendung von Reduktionsmitteln (+ Red) macht deutlich, dass ausschließlich die schwere Kette modifiziert vorliegt. Abbildung 31 C zeigt die zu den Abbildungen 31 A und B zugehörige massenspektrometrische Analyse nach 10 min. Diese zeigt einen vollständigen Umsatz von F_{ab}-Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin) (MW: 48,548 kDa, schwarz) hin zu dem Klick-Produkt

F_{ab} -Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin-CF)-OH (MW: 49,051 kDa, rot). Die Reaktion verläuft somit innerhalb von 10 min vollständig hin zu dem gewünschten Diels-Alder Produkt.

In einer weiteren, von der Modifizierung durch Norb-CF unabhängigen Reaktion, wurde F_{ab} -Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin)-OH mit Norb-PEG chemoselektiv modifiziert.

Abbildung 32 stellt den zeitlichen Verlauf der Klick-Reaktion zwischen F_{ab} -Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin)-OH und Norb-PEG nach der enzymatischen Einführung von RHAAC(Tetrazin)-OH (+ TI; 1-3) und ohne vorherige enzymatische Einführung von RHAAC(Tetrazin)-OH (- TI; 4-6) dar. Diese Kontrolle wurde stellvertretend für alle Modifikationen mit Norbornen-Derivaten durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich bei der chemischen Einführung von Norb-PEG um eine unspezifische Reaktion handelt.

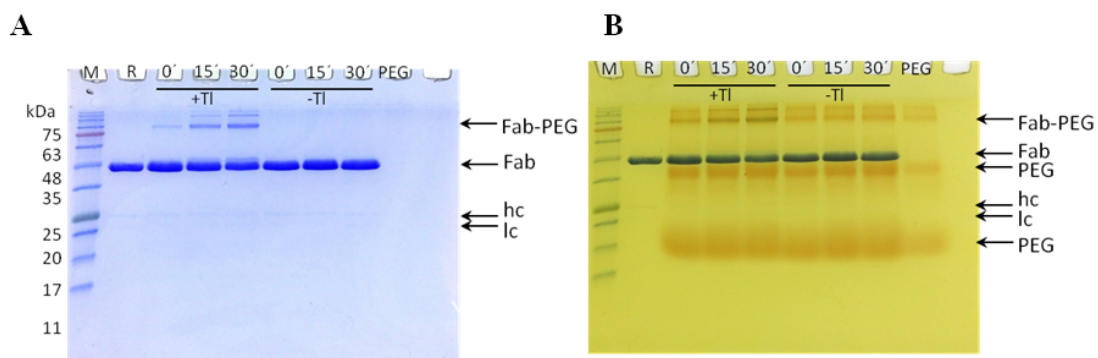


Abbildung 32. Zeitverlauf der chemischen Modifizierung von F_{ab} -Anti-TNF α -YRHAAC(Tetrazin)-OH mit Norb-PEG. A: Coomassie-Färbung. B: Iod-Färbung. R: Referenz (F_{ab} -Anti-TNF α -YRHStrep); Die Reaktion wurde mit (+TI) und ohne Trypsiligase (-TI) durchgeführt. M: Molekulargewichtsstandard. Lc: leichte Kette. Hc: schwere Kette. Reaktionsbedingungen: [F_{ab} -Anti-TNF α]: 100 μ M, [RHAAC(Tet)-OH]: 0.5 mM, [Trypsiligase]: 10 μ M, 100 mM HEPES buffer pH 7.8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 2 mM Norb-PEG (in 0.5 M HCl); 30 °C.

Dargestellt sind die Zeitwerte 0 min, 15 min und 30 min, wobei klar zu erkennen ist, dass eine PEG-Modifizierung jeweils nur nach vorheriger, enzymatischer, Einführung des Peptides RHAAC(Tetrazin)-OH (1-3; + TI) auftritt. Eine Iod-Färbung, dargestellt in Abbildung 32 B, konnte diesen Befund bestätigen. Zu erkennen ist dies an den intensiver gefärbten Banden bei 75 kDa (Abbildung 32 B, Bahn 3) im Vergleich zu den Bahnen 4-6. Somit ist auch eine orthogonale Pegylierung von F_{ab} -Fragmenten mit der beschriebenen Methode möglich.

5.9. ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DER MODIFIZIERTEN PROTEINE

Die Aktivitätsbestimmung der modifizierten Proteine wurde exemplarisch an der Peptidyl-Prolyl (*cis/trans*) Isomerase Cyclophilin 18 durchgeführt. Diese katalysiert die Isomerisierung peptidischer Prolylbindungen^[121]. Zur Ermittlung der enzymatischen Aktivität der Cyclophilinderivate wurde das Peptidsubstrat Suc-AFPF-pNA verwendet. Dieses verfügt über eine Prolylbindung, dessen Isomerisierung von *cis* nach *trans* durch Cyclophilin18 katalysiert wird. Ausschließlich das *trans*-konfigurierte Peptid stellt ein Substrat für die Protease Chymotrypsin dar. Diese spaltet die F-pNA-Bindung unter Freisetzung von p-Nitroanilin, welches bei einer Wellenlänge von 380 nm detektiert werden kann. Die Differenz der Hydrolyseeffizienz zwischen der durch Cyclophilin18 (CyP18) und der unkatalysierten Reaktion gilt als ein Maß für die Aktivität des Cyclophilinderivats. Verfügt das Enzym Cyclophilin18 nach der vollständigen chemischen und enzymatischen *N*-terminalen

Modifizierung über eine vergleichbare Aktivität wie das unmodifizierte *hCyclophilin18*, so kann davon ausgegangen werden, dass die Modifizierungsreaktionen keinen strukturellen Einfluss auf das modifizierte Enzym haben und somit biokompatibel verlaufen.

5.9.1. DANSYL-PS-RH-CYP18-OH

Am Beispiel von Strep-YRH-*hCyp18*-OH sollte der Einfluss der sowohl enzymatischen als auch enzymatisch-chemischen Modifizierung auf die Aktivität dieser modifizierten PPIasen analysiert werden. Im Zuge dessen wurde die nicht modifizierte Spezies Strep-YRH-CyP18-OH mit den modifizierten Proteinspezies PS-RH-CyP18-OH (enzymatisch), Norb(DnsTet)-RH-CyP18-OH (chemisch; Abbildung 27) und Dans-PS-RH-CyP18-OH (chemisch; Abbildung 25) verglichen. Die verbleibende Aktivität nach der Modifizierung wird in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12. Aktivität der PPIasen vom Cyclophilin18-Typ vor und nach der enzymatischen bzw. chemischen Modifizierung. 35 mM HEPES, pH 7,8. [Chymotrypsin]: 0,2 mg/ml; [*hCyp18*]: 1 nM – 4 nM [Suc-AFPF-pNA]: 20 mM; 10 °C. Die Ergebnisse wurden durch drei voneinander unabhängige Messungen bestätigt mit einem Fehler kleiner als 3%.

	Spezies	Art der letzten Modifizierung	k_{cat}/K_M (mol ⁻¹ *sek ⁻¹)
1	Strep-CyP18-OH	Keine	4,2E ⁺⁰⁶
2	PS-RH-CyP18-OH	Enzymatisch	3,9E ⁺⁰⁶
3	Norb(Dns Tet)-RH-CyP18-OH	Chemisch – Diels-Alder	4,28E ⁺⁰⁶
4	Dans-PS-RH-CyP18-OH	Chemisch - Cu-Klick (Lösung)	0

Tabelle 12 zeigt die enzymatische Aktivität der unterschiedlichen Cyclophilinderivate vor (Tabelle 12, 1) und nach der Modifizierungsreaktion (Tabelle 12, 2-4). Das Cyclophilinderivat Strep-Cyp18-OH zeigt einen Wert für k_{cat}/K_M von $4,2 \cdot 10^6$ mol⁻¹*sek⁻¹. Dieser Wert kann als Referenz verwendet werden. Die enzymatische Umsetzung von Strep-Cyp18-OH zu PS-RH-CyP18-OH führt zu keinerlei Aktivitätseinbußen, da ein Wert für k_{cat}/K_M von $3,9 \cdot 10^6$ mol⁻¹*sek⁻¹ ermittelt wurde. Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, dass die enzymatische Modifikation von Strep-CyP18-OH zu Norb-RH-CyP18-OH ebenfalls zu keinerlei Aktivitätsverlusten führte, da eine sich anschließende inverse Diels-Alder-Reaktion (Tabelle 12, 3) in einem aktiven Cyclophilinkonstrukt resultierte. Die kupferkatalysierte Klick-Reaktion hingegen führt zu einem vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität (Tabelle 12, 4).

Um abschätzen zu können, welche Komponente des komplexen Gemischs zur kupferkatalysierten Huisgen-Cycloaddition für den Aktivitätsverlust von CyP18 verantwortlich gemacht werden kann, wurde das Enzym mit den in Tabelle 13 aufgeführten Reagentien bei 10 °C für 60 min inkubiert; anschließend wurde anhand eines PPIase-Tests die Enzymaktivität bestimmt.

Tabelle 13 zeigt, dass die Inkubation von 50 µM Strep-YRH-CyP18-OH mit 250 µM CuSO₄ zur Inaktivierung der PPIase führt. Eine Konzentration von 50 µM CuSO₄ hat hingegen keinerlei negativen Einfluss auf die PPIase-Aktivität. Fügt man jedoch den Liganden THPTA hinzu bleibt das Protein auch mit einem Überschuss von 250 µM Kupfersulfat über den Inkubationszeitraum hinweg stabil. Ebenso Na-Ascorbat oder Aminoguanidin (AG) alleine haben keinerlei negativen Einfluss auf das Cyclophilinkonstrukt. Erst die Reduktion des Ligand-Kupfer Komplexes mit 10 mM Na-Ascorbat,

Aminoguanidin und THPTA führt abermals zu einer Inaktivierung von Strep-CyP18-OH; somit spricht einiges dafür, dass Cu(I) für den Aktivitätsverlust verantwortlich ist.

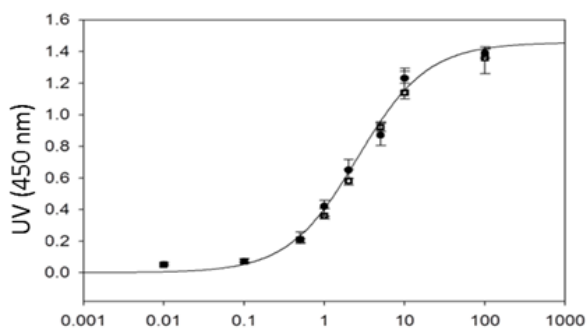
Tabelle 13. Bestimmung der Einflüsse der Einzelkomponenten einer Klick-Reaktion auf die PPIase-Aktivität von Strep-YRH-CyP18-OH. 0,1 M HEPES-Puffer, 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, pH: 7,8; 10 °C. [Strep-YRH-CyP18-OH]: 50 µM; 10 °C. PPIase-Test: 35 mM HEPES, pH 7,8. [Chymotrypsin]: 0,2 mg/ml; [*h*CyP18]: 1 nM – 4 nM [Suc-AFPF-pNA]: 20 mM; 10 °C. Inkubationszeit: 60 min. ++: normale Aktivität; - kompletter Verlust der Aktivität

CuSO ₄		THPTA/CUSO ₄	Ascorbat	AG ²⁰	THPTA/CuSO ₄ /Ascorbat/AG
[µM]		[µM]	[µM]	[µM]	[µM]
50	250	1250 / 250	10	10	1250 / 250 / 10000
++	-	++	++	++	-

5.9.2. F_{ab}-ANTI-TNFA-YRHAAC(CF)-OH UND F_{ab}-ANTI-HER2-YRHAC(DM1)-OH

Im Falle der F_{ab}-Konstrukte F_{ab}-Anti-TNFα und F_{ab}-Anti-Her2 wurde nicht, wie im Beispiel der Modifizierung von CyP18, zuerst das Norbornen-Derivat enzymatisch eingeführt sondern ein Nukleophil-Peptid, welches mit einem Maleimido-Benzoyl-Tetrazin modifiziert vorlag (siehe Abschnitt 5.6.3). Inwiefern die Kombination aus enzymatischer und chemischer Reaktion einen Einfluss auf die Funktionalität des F_{ab}-Fragments hat, sollte mit Hilfe eines ELISA-Experimentes bestimmt werden. Da es sich bei einem Antikörper(-Fragment) nicht um ein Enzym handelt dessen Aktivität bestimmt werden kann, konnte die Funktionalität der funktionalisierten F_{ab}-Fragmente nur durch den Vergleich der Bindungskonstanten zu deren nativen Bindungspartnern TNFα oder dem mimetischen Peptid Bio-PEG-QLGPYELWELSH vor- und nach der Modifizierung überprüft werden. Hierbei wird das Antigen immobilisiert und mit dem entsprechenden Bindungspartner inkubiert. Die Visualisierung der Antigen-Antikörper Bindung erfolgt durch eine erneute Inkubation mit einem gegen die schwere Kette des F_{ab}-Fragmentes gerichteten Antikörper. Dieser liegt konjugiert mit einer Peroxidase vor. Nach Applikation eines chromogenen Peroxidasesubstrats kann die Bindungsaffinität des F_{ab}-Fragmentes zu seinem Antigen bestimmt werden. Hierbei ist der freiwerdende (messbare) Farbstoff ein Maß für die Bindungsaffinität zwischen Antigen und Antikörper (Abbildung 33).

A



B

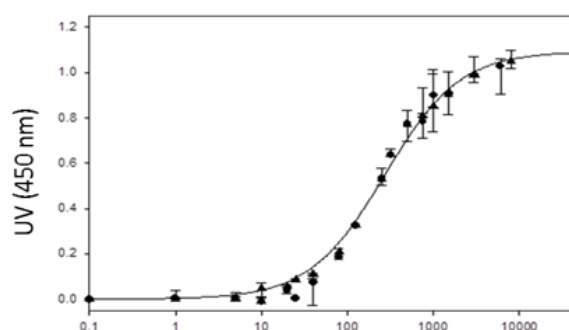


Abbildung 33. ELISA Test der modifizierten F_{ab}-Fragmente F_{ab}-Anti-TNFα-YRHAAC(CF) und F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(DM1) mit den jeweils unmodifizierten Edukten F_{ab}-Anti-TNFα-YRH-Strep bzw. F_{ab}-AntiHer2-YRH-Myc. A: ELISA von F_{ab}-Anti-TNFα-YRHAAC(CF) (■) und F_{ab}-Anti-TNFα-YRH-Strep (●) B: ELISA von F_{ab}-Anti-Her2-YRH-Myc (●) und F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(DM1) (▲)

²⁰ Aminoguanidin

In Abbildung 33 wird das Ergebnis der Bindungsstudie zwischen TNF α und F_{ab}-Anti-TNF α (Abbildung 33 A) bzw. Bio-PEG-QLGPYELWELSH und F_{ab}-Anti-Her2-YRHAC(DM1) (Abbildung 33 B) dargestellt. Konstatieren lässt sich hieraus, dass weder die enzymatische Modifizierung noch der sich daran anschließende chemische Modifizierungsschritt einen Einfluss auf die Funktionalität des F_{ab}-Fragmentes haben. Die Modifizierungsprozedur hat somit auf die Bindungseigenschaften der jeweiligen F_{ab}-Fragmente keinerlei Einfluss.

6. DISKUSSION

6.1. ENZYMATISCHE MODIFIZIERUNG VON PROTEINEN

6.1.1. INITIALE HYDROLYSESTUDIEN

Um die neu erstellten Trypsinvarianten im Hinblick auf deren Histidinerkennung (1), Induzierbarkeit (2) durch Zinkionen und Hydrolyseaktivität (3) miteinander vergleichen zu können, wurden sie mit den Spaltpeptiden Bz-AAYRHAAG-OH, Bz-AAYRAHAAG-OH und Bz-AAYRAAG-OH in Gegenwart von Zink oder EDTA inkubiert und deren Produkte chromatographisch auf deren Umsatzrate durch die jeweilige Trypsinvariante hin analysiert. Die Auswahl der Peptide erfolgte bezüglich der Variation der Position der Histidinfunktionalität (P_2' und P_3' -Position). Das histidinfreie Peptid Bz-AAYRAAG-OH wurde zu Vergleichszwecken verwendet.

Zur Veranschaulichung der positionsabhängigen Histidinerkennung (1) und der induzierten Erkennung von Histidin durch Komplexbildung zwischen Substrat und Trypsinvariante (2) wurden Quotienten aus den initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der unterschiedlichen Trypsinvarianten gebildet.

Die Hydrolyseaktivität (3) der einzelnen Trypsinvarianten in Relation zu der Trypsinvariante mit der höchsten Aktivität lässt sich direkt Abbildung 6 entnehmen. TrypsinligaseII hydrolysiert das Peptid BzAAYRAHAG zwischen Tyrosin und Arginin mit der höchsten Effizienz.

Zur Ermittlung der spezifischen Erkennung von Histidin in der P_3' - bzw. P_2' -Position (1) wurde das Verhältnis aus der initialen trypsinkatalysierten Hydrolyse des Peptids Bz-AAYRAHAAG-OH und der Peptide Bz-AAYRHAAG-OH und Bz-AAYRAAG-OH jeweils in Gegenwart von Zink bestimmt (Abbildung 34). Zur Bestätigung einer zinkioneninduzierten Erkennung der Peptide (2) durch die jeweilige Trypsinvariante wurde das Verhältnis der initialen Hydrolysegeschwindigkeit der einzelnen Peptide mit und ohne Zinkionen (mit EDTA) verwendet (Abbildung 35).

Histidinerkennung (1)

Der Wert für den Quotienten der initialen Hydrolysegeschwindigkeit aus Bz-AAYRAHAG-OH und Bz-AAYRHAAG-OH (Abbildung 34, blau) illustriert, wie gut die einzelnen Trypsinvarianten zwischen den Histidinpositionen in P_2' und P_3' unterscheiden können. Werte über 1 geben eine bevorzugte Erkennung von Histidin in der Position P_3' an während Werte unter 1 eine bessere Erkennung von Histidin in der Position P_2' anzeigen. Ähnliches gilt für den Quotienten der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der Peptide Bz-AAYRAHAG-OH und Bz-AAYRAAG-OH. Dieser gibt einen Anhaltspunkt für die Güte der allgemeinen Histidinerkennung in der P_3' -Position gegenüber Peptiden ohne Histidinfunktionalität. (Abbildung 33, rot). Bedingung für eine geeignete Variante ist die bevorzugte Erkennung von Peptiden mit Histidinen in P_3' -Position gegenüber Peptiden ohne Histidin oder Peptiden mit Histidinen in P_2' -Position.

Alle getesteten Trypsinvarianten erkennen Histidinreste in der P_3' -Position. Die Trypsinvariante K60E/D189K/I73H/N74H (Abbildung 33 G; vordere, blaue Reihe) unterscheidet hier jedoch nur kaum zwischen den Positionen P_2' und P_3' für die Histidinerkennung. Alle übrigen Trypsinvarianten

erkennen Peptide mit der Histidinseitenkette in P_3' mindestens um das doppelte besser als Peptide, die die Histidinseitenkette in P_2' tragen. Eine besonders gute Diskriminierung zwischen Histidinseitenketten in den Positionen P_2' und P_3' zeigen die Trypsinvarianten E und F. Die Bedingung zur besseren „Erkennung“ von Histidinseitenketten in P_3' -Position ist somit bei nahezu allen generierten Trypsinvarianten gegeben. Betrachtet man jedoch das Verhältnis aus den initialen Hydrolyseraten der Peptide Bz-AA YRAHAAG-OH und Bz-AA YRAAG-OH, so fällt auf, dass von den Trypsinvarianten C-G (Abbildung 34, hintere Reihe) entweder nicht zwischen Histidin und Alanin in P_3' -Position diskriminiert wird oder Peptide ohne Histidin besser umgesetzt werden. Das lässt darauf schließen, dass bei diesen Varianten keine bzw. eine nur sehr geringe Histidinpräferenz vorhanden ist, obgleich Spaltpeptide mit Histidinfunktionalitäten in Gegenwart von Zink in P_3' , wie beschrieben, besser umgesetzt werden als Peptide mit Histidinfunktionalitäten in P_2' (Abbildung 34, vordere Reihe). Lediglich die Trypsinvarianten B und H (Abbildung 34) hydrolysieren bevorzugt Peptide mit einer Histidinfunktionalität in P_3' gegenüber einer Histidinfunktionalität in P_2' -Position in Kombination mit einer wesentlich verbesserten Histidinerkennung gegenüber Peptiden mit fehlender Histidinfunktionalität.

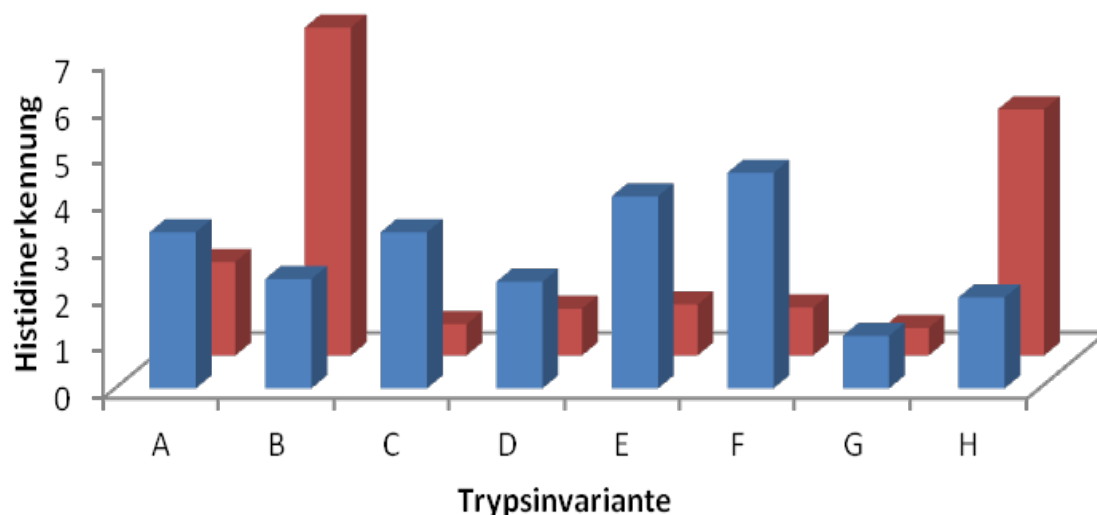


Abbildung 34. Quotient der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der Peptide BzAA YRAHAG und BzAA YRAAG sowie BzAA YRAHAG und BzAA YRHAG zur Veranschaulichung der bevorzugten substratseitigen Histidinerkennung der Trypsinvarianten A-H in Gegenwart von Zinkionen. **A:** K60E/D189K/F41H/N74H; **B:** K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H; **C:** K60E/D189K/F41H/Y59H; **D:** K60E/D189K/N34H; **E:** K60E/D189K/Y39H/N74H; **F:** K60E/D189K/Y39H/I73H; **G:** K60E/D189K/I73H/N74H; **H:** K60E/D189K/Y39H/Y59H²¹. ■ BzAA YRAHAG/BzAA YRAAG; ■ BzAA YRAHAG/BzAA YRHAG

Somit wird die Bedingung für die bevorzugte (zinkionenvermittelte) Erkennung von Histidinseitenketten in P_3' -Position gegenüber Peptiden ohne Histidinseitenketten oder Histidinseitenketten in P_2' -Position nur von den Trypsinvarianten K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H und TrypsinligaseII (Abbildung 34; B, H) erfüllt.

Induzierbarkeit durch Zn^{2+}

Die Induzierbarkeit der Erkennung von Histidinfunktionalitäten der einzelnen Trypsinvarianten durch Zinkionen wurde durch die Bildung des Quotienten aus den initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der Spaltpeptide Bz-AA YRAHAAG, Bz-AA YRHAAG und Bz-AA YRAAG in Gegenwart von Zinkionen

²¹ TrypsinligaseII

und den initialen Hydrolysegeschwindigkeiten derselben Peptide in Gegenwart von EDTA gebildet (Abbildung 35 A-H). Da die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten bei einer sehr guten Erkennung des Peptids durch die Trypsinvariante höher sind als bei einer schlechten stehen auch hier hohe Werte für ein großes Maß an Induzierbarkeit durch Zinkionen. Bei Betrachtung von Abbildung 35 fällt auf, dass ebenfalls ausschließlich die Trypsinvarianten K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H (Abbildung 35 B) und K60E/D189K/Y39H/Y59H (Abbildung 35 H) eine Induzierbarkeit durch Zinkionen zeigen; d.h. dass ausschließlich diese Trypsinvarianten Spaltpeptide mit Histidinfunktionalitäten in den Positionen P₂' und P₃' zinkioneninduziert erkennen können. Bei den Trypsinvarianten A und C-G zeigen die ermittelten Werte jedoch das Gegenteil einer Induzierbarkeit durch Zinkionen; diese Trypsinvarianten weisen durch die Anwesenheit von Zinkionen keine oder nur eine geringfügig verbesserte Hydrolyseaktivität auf.

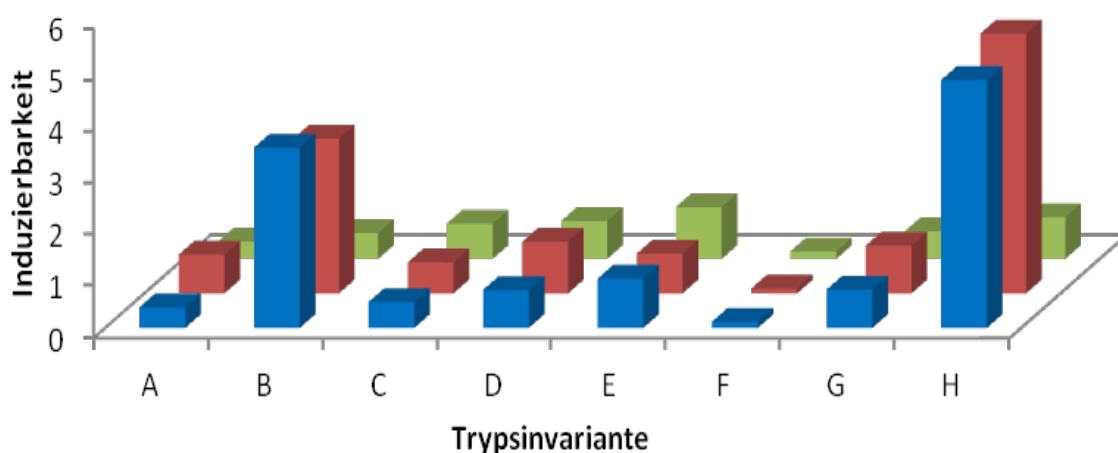


Abbildung 35. Induzierbarkeit der Erkennung von Histidinseitenketten in Gegenwart von Zinkionen. Quotient aus der initialen Hydrolysegeschwindigkeit mit Zink und ohne Zink bzw. mit EDTA. **A:** K60E/D189K/F41H/N74H; **B:** K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H; **C:** K60E/D189K/F41H/Y59H; **D:** K60E/D189K/N34H; **E:** K60E/D189K/Y39H/N74H; **F:** K60E/D189K/Y39H/I73H; **G:** K60E/D189K/I73H/N74H; **H:** K60E/D189K/Y39H/Y59H²². Bz-AAyRAHAAG-OH: Zn²⁺/EDTA ■; Bz-AAyRHAAG-OH: Zn²⁺/EDTA ■; Bz-AAyRAAG-OH: Zn²⁺/EDTA ■

Betrachtet man nun die erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die Induzierbarkeit der einzelnen Trypsinvarianten durch Zinkionen und deren Spezifität bei der Erkennung von Histidin in den Peptiden Bz-AAyRHAAG-OH und Bz-AAyRAHAG-OH im Kontext der initialen Hydrolysegeschwindigkeit, so zeichnet sich ein klares Bild über die Verwendbarkeit der einzelnen Trypsinvarianten zur Derivatisierung von Peptiden und Proteinen ab. Entscheidend sollte hierfür generell eine hohe Umsatzgeschwindigkeit und eine zinkinduzierte Erkennung von Histidinseitenketten in der P₃'-Position des Substrates sein. In Frage kommen für eine weitere Verwendung demnach nur die Trypsinvarianten K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H und K60E/D189K/Y39H/Y59H. Vergleicht man nun die Umsatzgeschwindigkeiten von Bz-AAyRAHAAG-OH beider Trypsinvarianten miteinander, so zeigt die Trypsinvariante K60E/D189K/Y39H/Y59H mit 0,08 mM/min im Vergleich zu 0,04 mM/min der Trypsinvariante K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H für die zinkinduzierte Spaltung des Peptids Bz-AAyRAHAAG-OH eine um einen Faktor von zwei höhere Umsatzgeschwindigkeit (siehe 5.4.1. Initiale Hydrolysestudien, Abbildung 6). Die Trypsinvariante K60E/D189K/Y39H/Y59H wird daher der Trypsinvariante K60E/D189K/Y39H/H40A/Y59H vorgezogen und im Weiteren als Trypsiligasell bezeichnet.

²² Trypsiligasell

Da in einem weiteren Schritt gezeigt werden konnte (Abbildung 8), dass auch die Hydrolyse an einem die Erkennungssequenz-tragenden Protein (Strep-YRAH-CyP18-YRH) mit Hilfe der Trypsiligasell mit einer Ausbeute von nahezu 100% funktioniert, bedarf es demzufolge bei dieser Reaktion auch keiner weiteren Optimierung.

Kinetische Charakterisierung von Trypsiligasell

Die Michaelis-Konstante K_M gibt die Substratkonzentration bei Halbsättigung des Enzyms an. Je kleiner der Wert für K_M ist, desto eher ist eine Sättigung des Enzyms erreicht. Somit ist die Michaelis Konstante, auch ein Maß für die Affinität des jeweiligen Enzyms zu seinem Substrat. k_{cat} wird auch als Wechselzahl bezeichnet und gibt an, wie „schnell“ das Acyl-Enzym-Intermediat ausgebildet wird. Hohe Werte für k_{cat} stehen somit für eine „schnelle“ Ausbildung des Acyl-Enzym Intermediats. Der Wert für den Quotienten aus k_{cat} und K_M gilt als Maß für die katalytische Effizienz des Enzyms. Er ist somit ebenso ein Maß für die Substratspezifität; hohe Werte stehen entsprechend für eine hohe Substratspezifität. Die kinetischen Konstanten K_M und k_{cat} wurden für die durch Trypsiligasell katalysierte Hydrolyse der Histidin-variablen Peptide Bz-AA \dot{Y} RAHAAG-OH und Bz-AA \dot{Y} RAAHAG-OH (P_3' und P_4') bestimmt (siehe 5.4.1. Initiale Hydrolysestudien, Tabelle 10). Die K_M -Werte für die Hydrolyse von Bz-AA \dot{Y} RAHAAG-OH liegen bei 0,64 mM; für die Hydrolyse des Peptids Bz-AA \dot{Y} RAAHAG-OH liegt der Wert für K_M bei 0,78 mM. Die katalytische Konstante k_{cat} ergab für beide Peptide einen Wert von ca. $0,2 \cdot \text{sec}^{-1}$. Der Umstand, dass der K_M -Wert für beide verwendete Peptide, wenn auch nur geringfügig, unterschiedlich ist, deutet auf eine unterschiedlich große Effizienz bzw. Spezifität bei der Erkennung der Histidinreste in den Positionen P_3' und P_4' hin, was sich anhand der Werte für k_{cat}/K_M ($0,35 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $0,29 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) bestätigt. Zu erwarten war jedoch eine wesentlich bessere oder schlechtere Erkennung des Peptids in P_4' , da sich beide Histidinseitenketten diametral gegenüberstehen und demnach nicht in derselben Bindungstasche einbinden können. Eine Erklärung für die experimentelle Beobachtung könnte die Tatsache sein, dass mehrere in der Trypsinvariante vorhandene Histidinseitenketten potentielle Wechselwirkungspartner für Histidinfunktionalitäten im Substrat in Gegenwart von Zinkionen darstellen können. Voraussetzung hierbei ist ausschließlich der passende Abstand zwischen der Histidinseitenkette im Substrat und denen der Trypsinvariante. Zur Interaktion stehen prinzipiell drei Histidinseitenketten im S' -Bereich zur Verfügung: H39, H40, H59; denkbar wäre also durchaus, dass Histidinreste in den Positionen P_3' und P_4' ähnlich einbinden und demnach auch vergleichbare K_M -Werte aufweisen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Peptide Bz-AA \dot{Y} RAHAAG-OH und Bz-AA \dot{Y} RAAHAG-OH ebenfalls hemmend bei hohen Konzentrationen auf die Trypsiligasell (Abbildung 7) wirken. Dies zeigt, dass die Einbindung dieser Peptide in der Substratbindungsstelle in S_3' bzw. S_4' zumindest nicht optimal verläuft bzw. bei hohen Konzentrationen möglicherweise zu Fehleinbindungen und damit zur Verminderung der enzymatischen Aktivität führt. Des Weiteren handelt es sich bei der korrespondierenden Bindungsregion der Trypsinvariante in S_2' um eine definierte Bindungstasche während S_3' und S_4' keine räumlich definierten Bindungstaschen mehr darstellen. Somit verwundert nicht, dass sich die K_M -Werte für die Peptide mit Histidinseitenketten in den Positionen P_3' (0,64 mM) und P_4' (0,78 mM) nur marginal voneinander unterscheiden, während der Unterschied zu dem Peptid mit der Histidinseitenkette in P_2' -Position wesentlich größer ist. Für dieses Peptid konnte ein Wert für K_M von 1,61 mM und ein Wert für die Substratspezifität k_{cat}/K_M von $0,11 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt werden; sie liegen somit ca. um einen Faktor 3 schlechter als für das Peptid Bz-AA \dot{Y} RAHAAG d.h., dass der Histidinrest in P_2' -Position mit einer geringeren Effizienz von der Trypsinvariante erkannt wird. Somit unterscheidet die Trypsinvariante stärker zwischen den Positionen P_2' und P_3' als zwischen den

Positionen P₃' und P₄', was sich durch strukturelle Gegebenheiten der Trypsinvariante erklären lässt. Die kinetischen Konstanten für die Spaltpeptide mit Histidinseitenketten in den Positionen P₂', P₃' und P₄' lassen zusammenfassend den Schluss zu, dass es gelungen ist, eine zinkinduzierte Histidinspezifität für TrypsiligaseII in S₃'-Position zu erzeugen.

6.1.2. INITIALE ACYLTRANSFERREAKTIONEN

Acyltransferreaktionen (*N*-terminale Modifikation) mit den Acylakzeptorpeptiden RHAAK(5,6CF), RAHAK(5,6CF) und RAAHK(5,6CF) (P₂', P₃', P₄') und dem Acyldonor Boc-Ala-OGp sollten die Ergebnisse von TrypsiligaseII aus den initialen Hydrolyseexperimenten bestätigen. Hierbei wurden die Konzentrationsverhältnisse zwischen Acyldonor und Acylakzeptor variiert (5.4.2. Initiale Acyltransferreaktionen). In Abhängigkeit sowohl von dem Histidinhaltigen Peptid als auch von dem verwendeten Konzentrationsverhältnis aus Acyldonor und Acylakzeptor wurden Ausbeuten in einem Bereich zwischen 5% und 100% erreicht. Eine Acyltransferausbeute konnte unabhängig von dem gewählten Peptid durch den Einsatz einer hohen Nukleophilkonzentration erzielt werden. Hierbei lagen die Ausbeuten bei 17% im Falle des Acylakzeptors mit der Histidinfunktionalität in P₂' (RHAAK(5,6CF)), bei 100% unter Verwendung des Acylakzeptors mit einem P₃'-Histidin (RAHAK(5,6CF)) und bei 38% unter Einsatz eines Histidinrestes in P₄' (RAAHK(5,6CF)). Dieses Ergebnis überrascht aufgrund der sehr ähnlichen Spezifitätskonstanten der Trypsiligase für Histidin in den Positionen P₃' und P₄'.

Zusammenfassend resultieren zwei unterschiedliche Effekte in einer hohen Produktausbeute bei der Acyltransferreaktion: eine der Trypsinvariante entsprechende Erkennungssequenz und eine erhöhte Nukleophilkonzentration.

Die quantitative Ausbeute, die ausschließlich für das Acylakzeptorpeptid RAHAK(5,6CF)-NH₂ erreicht wurde bestätigt sowohl die Spezifität von TrypsiligaseII für Histidinfunktionalitäten in der P₃'-Position als auch die ermittelten K_M-Werte für Spaltpeptide mit Histidinseitenketten in unterschiedlichen Positionen (siehe Tabelle 10). Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Reaktionen die Erkennungssequenz **-RAH-** im Zusammenhang mit dieser Trypsinvariante verwendet.

6.1.3. N-TERMINALE MODIFIZIERUNG VON PEPTIDEN UND PROTEINEN

Trypsiligase und TrypsiligaseII katalysierten die Acyltransferreaktion der Peptide RHAAK(5,6CF) und RAHAK(5,6CF) auf Pentinsäure-OGp mit einer nahezu quantitativen Ausbeute (siehe Abschnitt 5.4.2. Abbildung 10 und Abbildung 11) innerhalb einer Stunde. Die Bedingungen für diese Reaktion können somit für die Modifizierung von Proteinen ohne weitere Optimierungen verwendet werden. Mit 4-Pentinsäure konnten, diese Reaktionsbedingungen verwendend, die Proteine *h*Pin1 (Abbildung 13), *E. coli* Parvulin10 (Abbildung 14), YRH-CyP18-OH (Abbildungen 15, 16) sowie YRAH-CyP18-YRH (Abbildung 17) im Zuge einer Acyltransferreaktion mit dem Alkin 4-Pentinsäure modifiziert werden (siehe Abschnitt 5.5.). Dabei spielte die Größe des zu modifizierenden Proteins offenbar nur eine untergeordnete Rolle, da alle Proteine, unabhängig vom Molekulargewicht nahezu vollständig enzymatisch modifiziert werden konnten. Eine Ausnahme bildete das Proteinkonstrukt Strep-YRAH-CyP18-YRH. Dieses lag nach der Zugabe von TrypsiligaseII nach einer Stunde noch zu einem nicht unerheblichen Teil unmodifiziert vor (siehe Abschnitt 5.5.4 Abbildung 17 B). Die der Acyltransferreaktion vorgelagerte Hydrolysereaktion von Strep-YRAH-CyP18-YRH führt wie in Abbildung 17 C gezeigt zur Entstehung von drei Proteinspezies: dem Acyltransferprodukt PS-RAH-CyP18-YRH, dem Proteolyseprodukt RAH-CyP18-YRH.

Dieses Ergebnis bestätigt die initialen Hydrolyseexperimente im Zuge derer eine um den Faktor 2 bessere Erkennung von Histidinfunktionalitäten in der Position P₃ ggü. der Position P₂ ermittelt wurde. Die Modifizierung des Proteinkonstrukts YRAH-Cyp18-YRH durch TrypsiligaseII ergab ausschließlich die oben genannten Produkte; eine Hydrolyse der Sequenz -YRH- fand nicht statt. Da für alle genannten Proteinkonstrukte vergleichbare Analysezeiten gewählt wurden, befinden sich die Reaktionen in unterschiedlichen Stadien. Abbildung 25 D (siehe Abschnitt 5.8.1) zeigt jedoch einen vollständigen chemischen Umsatz und somit auch eine vollständige Acyltransferreaktion nach einer auf 2 h verlängerten Reaktionszeit.

6.1.4. C-TERMINALE MODIFIZIERUNG VON PEPTIDEN UND PROTEINEN

Initiale Experimente zur C-terminalen Peptid- und Proteinmodifizierung mit TrypsiligaseII (Transamidierung), wurden mit dem in Acyltransferexperimenten bevorzugten Acylakzeptor RAHAK(5,6CF)-NH durchgeföhrt. Als Acyldonoren wurden die Spaltpeptide Bz-AAYRAHAAG-OH und Bz-AAYRAAHAG-OH gewählt, um den Einfluss der Acyldonors bzw. die Position von Histidin im Acyldonor, auf die Transamidierungsreaktion zu untersuchen. Hierzu erfolgte eine Variation der Konzentrationsverhältnisse von Acyldonor zu Acylakzeptor. Bei Verwendung von 0,5 mM Bz-AAYRAHAG-OH als Acyldonor und 4 mM RAHAK(5,6CF) als Acylakzeptor lieferte die durch TrypsiligaseII katalysierte Transamidierungsreaktion eine maximale Produktausbeute an Bz-AAYRAHAK(5,6CF) von ca. 28 %. Wird hingegen der Acyldonor in einer Konzentration von 4 mM verwendet, wurde eine maximale Produktausbeute (Acylakzeptor: RAHAK(5,6CF)) an Bz-AAYRAHAK(5,6CF) von ca. 48% erreicht. Begründet werden können die unterschiedlichen Produktausbeuten mit unterschiedlichen Konzentrationen an hydrolysierbarem Ligationsprodukt und Acylakzeptor.

Da die kinetischen Konstanten sowohl für den Acyldonor Bz-AAYRAHAAG-OH als auch das entsprechende Ligationsprodukt Bz-AAYRAHAK(5,6CF)-NH₂ als sehr ähnlich angenommen werden können (siehe Abschnitt Ergebnisse, 5.4.1. Tabelle 10), werden beide Substrate entsprechend ihrer Werte für K_M bzw. k_{cat} mit einer vergleichbaren Effizienz hydrolysiert bzw. umgesetzt. Verwendet man nun den Acyldonor (Bz-AAYRAHAAG-OH) in einem Überschuss, so ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass dieser hydrolysiert wird noch bevor das entstandene Ligationsprodukt Bz-AAYRAHAK(5,6CF) hydrolysiert werden kann. Erreicht der Acyldonor nach dessen Hydrolyse eine Konzentration, die der bereits entstandenen Menge an Ligationsprodukt ähnelt, so wird auch dieses abgebaut. Zudem fällt auf, dass die Aminolyserate (Produktbildung) eine Abhängigkeit von dem verwendeten Konzentrationsverhältnis zeigt (siehe Tabelle 14) Dies ist auf denselben Umstand des in hoher Konzentration verwendeten Acyldonors zurückzuführen, da durch dessen Überschuss eine Verlängerung der „aminolytischen“ Phase bewirkt werden kann. Somit ist es mit dieser Vorgehensweise möglich, einen vergleichsweise hohen Umsatz bezüglich des Acylakzeptors (Nukleophil) zu erzielen. Wird hingegen der Acylakzeptor RAHAK(5,6CF)-NH₂ enzymsättigend verwendet, so ist die Aminolysegeschwindigkeit um einen Faktor von sieben geringer als die Aminolyse bei Verwendung eines Überschusses an Acyldonor (Tabelle 14), welche in direktem Zusammenhang mit der zu erzielenden Ausbeute steht. Jedoch erweist sich hier das Ligationsprodukt als wesentlich stabiler als im Fall der enzymsättigenden Verwendung des Acyldonors Bz-AAYRAHAAG-OH (Tabelle 14), was direkt mit der Rückreaktion der Hydrolyse des Ligationsproduktes Bz-AAYRAHAK(5,6CF)-NH₂ in Verbindung gebracht werden kann: Durch den Überschuss an Nukleophil (RAHAK(CF)-OH) wird die Rückreaktion begünstigt (Abbildung 18 B).

Diese Vorgehensweise der sättigend eingesetzten Substrate ist jedoch nur bedingt praktikabel, da derart hohe Acyldonor- bzw. Akzeptorkonzentrationen im Falle eines Proteins aus Gründen der Löslichkeit nur in Ausnahmefällen realisierbar sind.

Tabelle 14. Initiale Produktbildung (Aminolyse) und Sekundärhydrolyse (Produkthydrolyse) des Ligationsproduktes Bz-AAVRAHAK(5,6CF)-OH bzw. Bz-AAVRAAHK(5,6CF)-OH. Acylakzeptor. Acylakzeptor war RHAK(5,6CF).

Acyldonor	Acyldonor/ Acylakzeptor	Produkthydrolyse (mM/min)	Aminolyse (mM/min)
Bz-AAVRAHAAG	8:1	0,0026	0,0439
Bz-AAVRAAHAG	8:1	0,0023	0,0361
Bz-AAVRAHAAG	1:8	0,0004	0,0061
Bz-AAVRAAHAG	1:8	0,0004	0,0027

Wie zu erwarten war, hat die Verwendung der unterschiedlichen Acyldonorpeptide Bz-AAVRAHAAG-OH und Bz-AAVRAAHAG-OH keinerlei Einfluss auf die Sekundärhydrolyse (Produkthydrolyse; Tabelle 14) des Ligationsproduktes. Die Sekundärhydrolyse ist mit $0,0004 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ bei Verwendung eines Überschusses an Acylakzeptor wesentlich geringer als bei Verwendung eines Acyldonorüberschusses ($0,0023 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Unterschiede bei der Verwendung von Acyldonorpeptiden mit Histidinseitenketten in P₃' bzw. P₄' im Zuge einer Transamidierungsreaktion sind vielmehr in der Aminolysegeschwindigkeit zu finden (Tabelle 14) und können somit auch die erreichten Ausbeuten erklären. Durch die Verwendung eines Effizienzparameters, der das Verhältnis aus Aminolyse und der entsprechend darauf folgenden Produkthydrolyse unter Berücksichtigung der erreichten Ausbeute quantitativ bewertet, lassen sich Transamidierungsreaktionen mit unterschiedlichen Trypsinvarianten und/oder Acyldonor/Akzeptorpaaren miteinander vergleichen (Tabelle 15).

Tabelle 15. Aminolyse:Hydrolyse Verhältnis und Effizienzparameter der von TrypsilgaseII katalysierten Transamidierungsreaktion mit RAHAK(5,6CF) als Acylakzeptor und variierenden Acyldonoren.

	Acyldonor	Acyldonor/ Acylakzeptor	Aminolyse/ Produkthydrolyse	Produktausbeute (%)	Effizienzparameter ²³
A	Bz-AAVRAHAAG	8:1	17	48	8
B	Bz-AAVRAAHAG	8:1	16	37	6
C	Bz-AAVRAHAAG	1:8	15	28	4
D	Bz-AAVRAAHAG	1:8	7	15	1

Wie Tabelle 15 zeigt, ist die Effizienz der Transamidierungsreaktion mit Bz-AAVRAHAAG-OH als Acyldonor und H-RAHAK(5,6CF)-OH als Acylakzeptor abhängig von den verwendeten Konzentrationsverhältnissen. Die Verwendung des Acyldonors im Überschuss führt zu einer mindestens doppelt so großen Transamidierungseffizienz als bei einer entsprechenden Verwendung des Acyldonors im Unterschuss. Bei der Histidinspezifität in P₄'-Position des Acyldonorpeptids ist die

²³
$$\frac{\text{Aminolyse} \left(\frac{\text{mM}}{\text{min}} \right) \times \text{Produktausbeute} (\%)}{\text{Hydrolyse} \left(\frac{\text{mM}}{\text{min}} \right) \times 100}$$

Transamidierungseffizienz im verwendeten Konzentrationsbereich (Abbildung 18) sogar um einen Faktor von sechs größer bei enzymsättigender Verwendung des Acyldonors als bei enzymsättigendem Einsatz des Acylakzeptors (Tabelle 15 B, D).

Im Weiteren wurden die beiden Trypsinvarianten Trypsiligase und TrypsiligaseII hinsichtlich ihrer Effizienzparameter miteinander verglichen. Es wurden Acyldonoren bzw. -akzeptoren entsprechend der Histidinspezifitäten der verwendeten Trypsinvarianten eingesetzt. Demnach erzielt die Trypsinvariante Trypsiligase eine um ca. 30% höhere Ausbeute an Transamidierungsprodukt Bz-AAYRHAAG(5,6CF)-OH als TrypsiligaseII, was bedingt durch ein zudem erheblich besseres Verhältnis aus Aminolyse zu Produkthydrolyse zu einer um das Vierfache verbesserte Transamidierungseffizienz führt (Tabelle 16).

Tabelle 16. Vergleich der Transamidierungseffizienz der Trypsinvarianten TrypsiligaseII (A) und Trypsiligase (B) bei enzymsättigender Verwendung des Acyldonors.

	Acyldonor	Aminolyse/ Produkthydrolyse	Produktausbeute (%)	Effizienzparameter ²³
A	Bz-AAYRHAAG	17	48	8
B	Bz-AAYRHAAG	42	78	32

Aufgrund der höheren Transamidierungseffizienz von Trypsiligase wurde diese für alle weiteren Transamidierungsreaktionen zur Modifizierung von Proteinen verwendet.

6.1.4.1. Optimierungsoptionen der Transamidierungsreaktion

Generell kann das Ligationsprodukt einer Transamidierungsreaktion von der jeweilig verwendeten Trypsinvariante genauso gut erkannt werden wie das Acyldonorpeptid selbst, da angenommen werden kann, dass beide K_M -Werte gleich oder zumindest ähnlich sind. Dieser Umstand macht ein „Abstoppen“ der Reaktion bei der größtmöglich erreichbaren Produktausbeute durch beispielsweise das Ansäuern des Reaktionsansatzes mit Essigsäure (Inaktivierung der Trypsinvariante) im Zuge einer kinetisch kontrollierten Reaktion notwendig. Da sowohl das Edukt als auch das Produkt über zwei „Erkennungszentren“ verfügen, nämlich Tyrosin in der S_1 -Tasche und $-RH-$ bzw. $-RAH-$ in der S' -Tasche der Trypsinvarianten Trypsiligase und TrypsiligaseII werden sowohl das Produkt als auch das Edukt besser von der Trypsinvariante erkannt als das Nukleophil (Acylakzeptor), welches nur in S_1' , S_2' oder S_3' der Trypsinvariante eingebunden werden kann. Somit werden das Einbinden und die entsprechende Hydrolyse des Acyldonorsubstrates bzw. des Ligationsproduktes wahrscheinlicher als die Einbindung des Acylakzeptorsubstrates. Eine quantitative Produktausbeute in einem Reaktionsschritt („Eintopfreaktion“) ist somit schon allein aus statistischen Gründen nur schwer zu erreichen; Abhilfe könnte hier ein Enzymreaktor schaffen, in dem die Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Komponenten in deren Konzentration konstant gehalten werden. Zur Optimierung der Reaktion im Hinblick auf die Stabilität und die Ausbeute an Ligationsprodukt könnte ein hydrophoberes aktives Zentrum der Trypsinvariante beitragen, welches Wasser demnach ausschließt. Des Weiteren gilt für die Optimierung von TrypsiligaseII hinsichtlich ihrer Transamidierungseffizienz, dass eine „Sequenzanpassung“ d.h. eine in einem rationellen bzw. evolutiven Ansatz herbeigeführte Verbesserung des K_M -Wertes des zu erkennenden Acylakzeptors sowohl auf Seiten des Substrats als auch des Enzyms zum Erfolg führen könnte.

²³ $\frac{\text{Aminolyse} \left(\frac{mM}{\min}\right) \times \text{Produktausbeute} (\%)}{\text{Hydrolyse} \left(\frac{mM}{\min}\right) \times 100}$

6.1.5. MODIFIZIERUNG VON ANTIKÖRPERN

Die Modifizierung von Antikörpern dient in der Hauptsache therapeutischen und diagnostischen Zwecken in der Medizin. Zudem werden modifizierte Antikörper auch in der akademischen Forschung benötigt, beispielsweise zur Visualisierung von zellulären Prozessen oder in immobilisierter Form zur Identifizierung bzw. Aufreinigung von Interaktionspartnern. Für die Modifizierung von Antikörpern werden oftmals chemische Methoden herangezogen, die jedoch, wie bereits einleitend beschrieben (1.2.4.), häufig zu unspezifischen Mehrfachmodifizierungen führen (v.a. an Sulfhydrylen, Aminen oder Carbonsäurefunktionalitäten). Eine Alternative stellt das Einfügen von modifizierbaren Aminosäureseitenketten dar, wie beispielsweise der Cysteinofunktionalität. Hierzu ist jedoch ein aufwendiges *screening* notwendig, um sicherzustellen, dass der Cysteinrest an einer Position eingebracht wird, welcher die Funktionalität und die Herstellung bzw. Expression des Antikörpers möglichst nicht beeinträchtigt ^[122, 123].

Bei der enzymatischen Modifizierung der Termini von Antikörpern muss generell beachtet werden, dass nur eine C-terminale Modifizierung unter Erhalt der Funktionalität von Antikörpern möglich ist. Eine N-terminale Modifizierung würde dagegen mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Verlust der Bindungsfähigkeit des Antikörpers führen, da die Antigenerkennung bzw. Bindung am N-terminalen Ende von Antikörpern erfolgt. Bislang wurden zur enzymatischen Modifizierung von Antikörpern vor allem Transglutaminasen verwendet ^[124-126]. Diese sind in der Lage, stabile Isopeptidbindungen zwischen zugänglichen Glutamin- und Lysinresten unter der Freisetzung von Ammoniak (in Form von NH_4^+) zu bilden. Um eine bessere Zugänglichkeit spezifischer Aminosäurereste durch die Transglutaminase zu gewährleisten, werden hierzu in der Regel Erkennungssequenzen für spezielle bakterielle Transglutaminasen (BTG) verwendet ^[126]. Der Nachteil beim Einsatz dieses Enzyms ist in der hohen Anfälligkeit für „Nebenreaktionen“ zu finden, da die Transglutaminase prinzipiell in der Lage ist, alle frei zugänglichen Glutaminreste zu modifizieren. Eine weitere Möglichkeit zur Einführung von Modifikationen in Antikörper ist die Verwendung sogenannter SNAP-Tags ^[127, 128]. Bei dieser Sequenz (Protein-Fusion) handelt es sich um ein Derivat des DNS-Reparaturenzyms O(6)-Alkylguanin DNS Alkyltransferase (AGT), welches Substrate erkennt, die O(6)-Benzylguanin enthalten. Zur Modifizierung muss die AGT auf DNS-Ebene mit dem zu modifizierenden Protein bzw. Antikörper fusioniert werden. Der Nachteil dieser Technologie liegt in der Größe der SNAP-Fusion (20 kDa) begründet. Es könnte die Funktionalität des zu modifizierenden Proteins bzw. Antikörpers eingeschränkt werden. Eine weitere Möglichkeit zur regiospezifischen Modifizierung von Antikörpern bietet das Formylglycin generierende Enzym (FGE). Dieses oxidiert Cysteinseitenketten zu Aldehyden, welche mit Derivaten des Hydroxylamins zu Oximen reagieren ^[59, 129]. Denkbar sind jedoch auch hier einige Nebenreaktionen, wie sie bei der Gegenwart von Aldehydfunktionalitäten in der Nähe von Proteinen zu erwarten sind, wie beispielsweise deren Denaturierung durch die Ausbildung von Azomethinen. Darüberhinaus ist zu erwarten, dass die zur Funktionalität des FGE benötigten reduzierenden Bedingungen nur schwer mit der Modifizierung der disulfidverbrückten Antikörper vereinbar sind; hier ist zu erwarten, dass die Ausbeute an funktionalem, aldehydfunktionalisiertem Antikörper entsprechend gering ausfällt. Bekannt sind weitere Technologien, die auch im Zusammenhang mit der Modifikation von Antikörpern verwendet werden, wie beispielsweise die Modifikation der nativ in jedem Antikörper vorhandenen Zuckerseitenketten mit sich anschließender chemischer Modifizierung ^[130] oder die bereits einleitend beschriebene Modifikation mit Hilfe des Enzyms Sortase ^[131].

Bei dem Modell-Antikörper F_{ab} -Anti-Her 2 handelt es sich um einen Antikörper gegen den Rezeptor Her2/neu, der die Zellproliferation steuert ^[132]. Dieser wurde rekombinant in *E.coli* als „Fab“ hergestellt und C-terminal mit der für Trypsiligase spezifischen Erkennungssequenz -YRH- versehen (Abbildung 36). Dieses „Antikörper-Fab“ wurde von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt. Bei dem zweiten modifizierten Antkörperfragment, welches ebenfalls von Frau Dr. Sandra Liebscher zu Verfügung gestellt wurde, handelt es sich um ein F_{ab} -Anti-TNF α -YRH-Strep-OH. Dieses F_{ab} -Fragment entstammt dem therapeutisch relevanten *Certolizumab pegol* (CIMZIA) und wird zur Behandlung von Morbus Crohn und anderer entzündlicher Erkrankungen klinisch verwendet ^[133, 134]. Das Antkörperfragment wurde ebenso rekombinant in *E. coli* hergestellt und C-terminal mit der Erkennungssequenz der Trypsiligase -YRH- und einer StrepII-Fusion versehen.

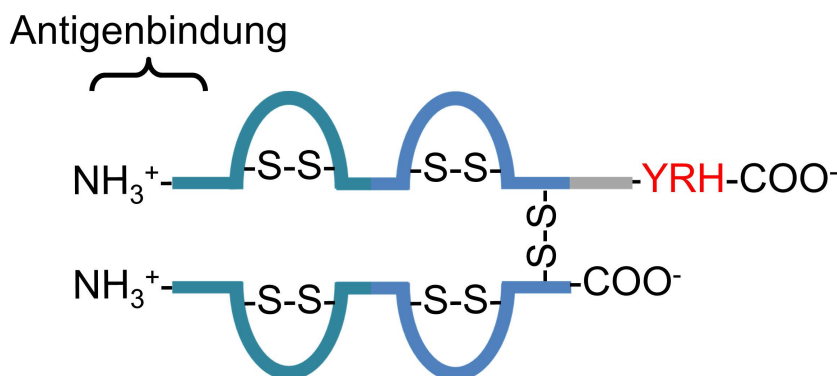


Abbildung 36. F_{ab} -Fragment mit einer C-terminalen Erkennungssequenz für Trypsiligase. Die schwere Kette liegt mit der Sequenz -YRH- modifiziert vor. Die Antigenbindung erfolgt am N-Terminus.

Modifiziert wurden F_{ab} -Anti-Her2-YRH-Strep, F_{ab} -Anti-Her2-YRH-Myc und F_{ab} -Anti-TNF α -YRH-Strep mit jeweils einem Tetrazinderivat (siehe Abschnitte 5.6.2 und 5.6.3) mit Hilfe der enzymatischen Transamidierungsreaktionen durch Trypsiligase. Die Tetrazinderivate lagen gebunden an ein Peptid mit der Erkennungssequenz RHAAC(Tetrazin)-OH bzw. RHAC(Tetrazin)-OH im Falle der Modifizierung von F_{ab} -Anti-Her2-YRH-Myc vor. Im Vergleich zu den übrigen, erfolgreich modifizierten Proteinen PS-RH-CyP18-OH, Norb-RH-Cyp18-OH, Dans-Par10-OH, PS-RH-Pin1-OH und PS-RAH-CyP18-YRHAAG-OH (siehe Abschnitt 5.8.) lag der Antikörper nach erfolgter Enzymreaktion in keinem der beschriebenen Fälle vollständig (quantitativ) modifiziert vor. Zwar verläuft auch hier die chemische Reaktion quantitativ; die Transamidierungsreaktion erreicht jedoch nur Ausbeuten im Bereich von 33%-70%. Sowohl das Edukt F_{ab} -YRH-Strep als auch das Spaltprodukt F_{ab} -Y-OH konnten neben dem gewünschten Produkt F_{ab} -YRHAAC(Tetrazin) bzw. F_{ab} -YRHAC(Tetrazin)-OH noch nachgewiesen werden. Dennoch konnte chromatographisch eine Ausbeute von ca. 70% im Fall von F_{ab} -Anti-Her2-YRHAC(Tetrazin)-OH bestimmt werden.

6.2. CHEMISCHE SYNTHESE DER EDUKTE

Zur chemischen Modifizierung enzymatisch eingeführter Anker sollten mehrere Substanzklassen verwendet werden. Dazu gehören die Azide, die Norbornene (Bicyclo [2.2.1] Hepten), Styrene, Alkine und die Tetrazine. Während sowohl die Grundkörper der Alkine als auch der Norbornene kommerziell erworben werden konnten, mussten die Styrene, Azide und Tetrazinderivate mit den gewünschten Eigenschaften *de novo* synthetisiert werden (siehe Abschnitt 4.4.4). Prinzipiell sollten die Modifizierungsagentien über zwei unterschiedliche Funktionalitäten verfügen; eine Funktionalität zur späteren chemischen Modifizierung am Protein (wie beispielsweise die Dreifachbindung des Alkins

oder der Tetrazinring); die andere Funktionalität (wie beispielsweise einer Carbonsäurefunktionalität) zur chemischen Kupplung mit der spezifitätsvermittelnden Gruppierung in Form eines Esters (OGp-Ester) oder einer trypsinspezifischen peptidischen Erkennungssequenz (Abbildung 37).

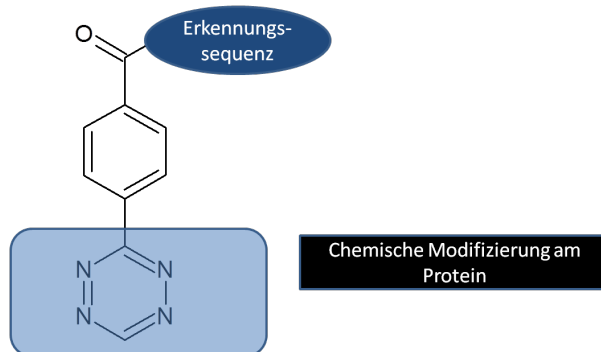


Abbildung 37. Chemische Anker zur Modifizierung von Proteinen. Allgemeine Struktur von Tetrazinylbenzoesäuretragenden Erkennungssequenzen.

6.2.1. CHEMISCHE SYNTHESE DER TETRAZINE UND DEREN REAKTIVITÄT

Üblicherweise werden Tetrazine in einer Eintopfreaktion aus einer „aktivierten“ Carbonylverbindung und Hydrazin^[94, 135-139] mit anschließender Oxidation durch entsprechende Oxidationsmittel wie Natriumnitrit, Wasserstoffperoxid oder Kaliumpermanganat^[94, 140] hergestellt. Bei der Verwendung unterschiedlicher Carbonylkomponenten können sowohl symmetrische als auch unsymmetrische Tetrazinderivate entstehen (Abbildung 38).

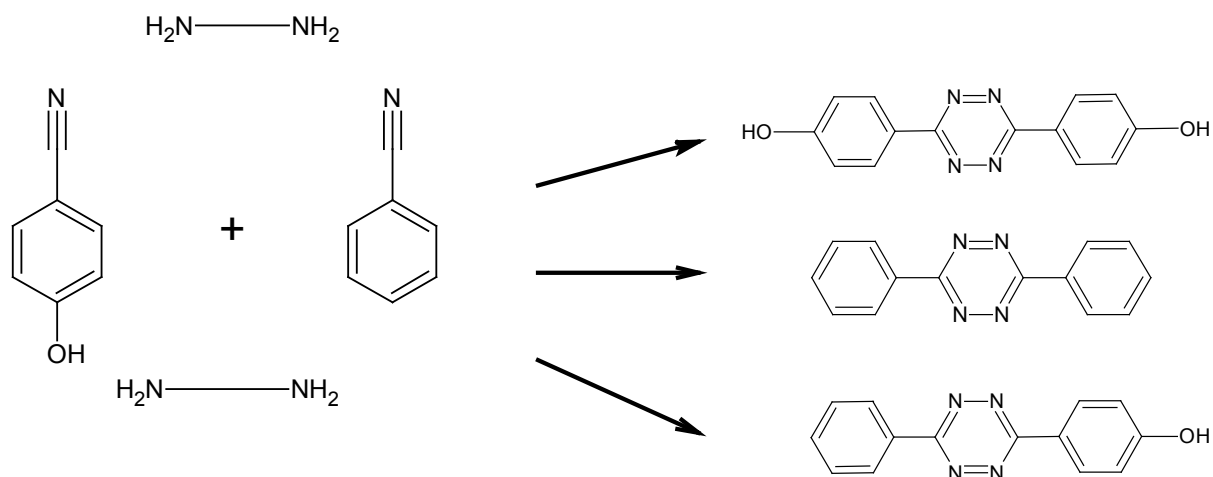


Abbildung 38. Verlauf der Synthese von Tetrazinderivaten aus Hydrazin, Benzoylnitril und 4-Hydroxybenzoylnitril. Bedingt durch die Reaktionsführung (Eintopfreaktion) können sowohl symmetrische als auch unsymmetrische Tetrazinderivate entstehen (siehe Text).

Um eine möglichst große Ausbeute bei der Synthese unsymmetrischer Tetrazinderivate zu erhalten, wurden zu diesem Zweck sowohl unterschiedlich aktivierte Carbonyl-Komponenten als auch verschiedene Reagentien zur *in situ* Aktivierung der Carbonylkomponente (Nitril) verwendet. Prinzipiell möglich sind weitere Syntheseverfahren zur Bildung von Dihydropyridazin ausgehend von

Hydrazidsäurederivaten wie Hydrazinoylchloriden, Thiohydraziden, Amidrazonen, Hydrazoneestern, Thiohydrazonestern usw., welche allesamt aus aktivierten Carbonsäurekomponenten wie Nitrilen, Imidaten oder Amidinen usw. hergestellt werden können ^[141]. Für die Synthesen der im Methodenteil beschriebenen Tetrazinderivate wurden mehrheitlich unterschiedlich aktivierte Komponenten verwendet. Zur Synthese von Tetrazinylbenzoesäure wurde eine Nitrilkomponente (Benzonitril) mit einem Amidin (Formamidin*Acetat) in Gegenwart von elementarem Schwefel zur Reaktion gebracht. Tetrazinylphenol hingegen wurde aus einem Imidomethylester (Ethyl-4-Hydroxybenzimidat*HCl) und einem Amidin (Formamidin*Acetat) ohne den Zusatz von Schwefel hergestellt.

Mechanistisch gesehen verlaufen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tetrazinsynthesen über die Zwischenstufe der Amidrazone. Amidrazone können aus Nitrilen über die Zwischenstufe der Thioamidine ^[142, 143], Amidine ^[144] oder Imidsäureester ^[145] hergestellt werden. Bei der Eintopfreaktion zur Synthese der Tetrazine findet die Bildung des Amidrazons als Zwischenprodukt *in situ* statt. Das Amidrazon wiederum reagiert mit einem Überschuss an Hydrazin oder einem weiteren Mol Amidrazon zum gewünschten Dihydotetrazin ^[146], der Vorstufe des finalen Tetrazins. Tetrazin wird schließlich durch Oxidation des Dihydotetrazins mit den bereits genannten Methoden erhalten.

Die Aktivierung des Nitrils verläuft vermutlich über die Bildung eines Thioamids, welches zu dem entsprechenden Amidrazon weiter reagieren kann. Das Hydrazin dient dabei sowohl als Nukleophil als auch als Reduktionsmittel zur Reduktion des Schwefels zu S^{2-} ^[147]. Das Sulfid reagiert mit dem Nitril zu dem entsprechenden Thioamid, welches dann nach der Reaktion mit Hydrazin unter Freisetzung von H_2S zur Bildung des entsprechenden Amidrazons ^[142] führt. Konkret bedeutet dies, dass die Synthese der Tetrazinylbenzoesäure aus 4-Cyanobenzoesäure und Formamidin ohne den Zusatz von elementarem Schwefel nicht das gewünschte Produkt liefert, da Nitrile ohne gesonderte Aktivierung durch beispielsweise H_2S offenbar nicht genügend reaktiv sind um mit Hydrazin zu Dihydotetrazin zu reagieren (Abbildung 39).

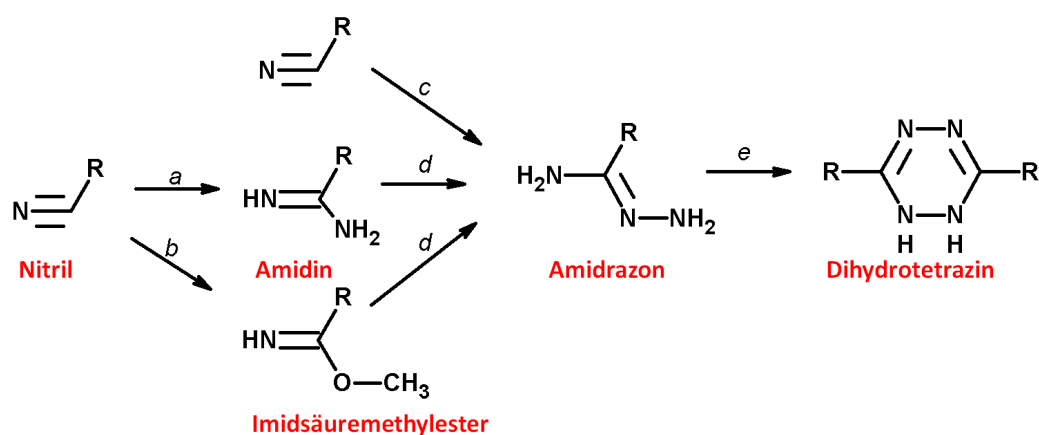


Abbildung 39. Mögliche Edukte bei der Synthese von Tetrazinen. Zur Synthese von Tetrazinderivaten können unterschiedliche Edukte wie Imidsäureethylester, Amidine, Nitrile oder Amidrazone herangezogen werden (siehe Text). Reaktionsbedingungen: a) H_2S /Ammoniumsalze; b) HCl /Methanol; c) S/N_2H_4 ; d) N_2H_4 ; e) weiteres mol Amidrazon

Bei der Synthese von 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure konnte lediglich eine Ausbeute von 10-20% nach dem Aufreinigungsschritt erhalten werden (siehe Abschnitt 5.1.2.1). Möglichkeiten der Effizienzsteigerung dieser Synthese könnten den Einsatz von Thioamiden anstatt der bislang genutzten Nitrile betreffen. Die direkte Verwendung von Amidrazonen wäre ebenso möglich.

6.2.2. Diels-Alder Reaktionen der Tetrazine

Modellreaktionen

Die Diels-Alder Reaktionen der Tetrazine unterscheiden sich von anderen Diels-Alder Reaktionen durch deren Elektronenbedarf. Diels-Alder Reaktionen mit normalem Elektronenbedarf benötigen elektronenreiche Diene und elektronenarme Dienophile zur Reaktion. Die Diels-Alder Reaktionen der elektronenarmen Tetrazinderivate (mit elektronenziehenden Substituenten in der 3- oder 6- Position) verhalten sich invers ^[148] hierzu; zur Reaktion werden elektronenarme Diene und elektronenreiche Dienophile benötigt, was eine gewisse Orthogonalität zwischen beiden Reaktionstypen erzeugt (normaler Elektronenbedarf und inverser Elektronenbedarf), so dass beide Reaktionstypen theoretisch parallel in einem Ansatz (Eintopf) verwendet werden könnten.

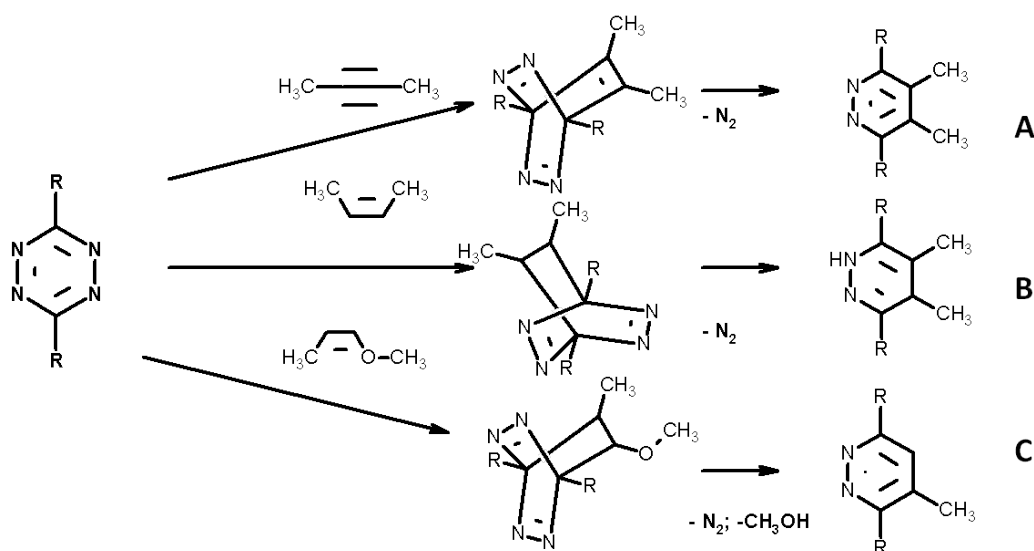


Abbildung 40. Reaktion von Tetrazinen mit Alkinen (A) sowie Alkenen mit (C) und ohne (B) eliminierbare Gruppierung. Bei der Reaktion von Tetrazinderivaten mit Alkinen (A) oder Alkenen mit- (C) oder ohne (B) eliminierbarer Gruppierung zu unterschiedlichen Pyridazinderivaten (siehe Text).

Als Diene bei den inversen Diels-Alder Reaktionen dienen in der Hauptsache elektronenreiche Diene wie z.B. die Norbornene ^[94], Styrole ^[149] oder Cyclooctine ^[150]. Des Weiteren sind jedoch auch Acetylene ^[151] oder Enolate ^[152] zu Cycloadditionsreaktionen mit Tetrazinen und deren Derivaten in der Lage.

Die Reaktionen zwischen elektronenakzeptorsubstituierten Tetrazinen und elektronendonorsubstituierten Dienophilen führen unter Verlust von molekularem Stickstoff in Abhängigkeit von dem verwendeten Dienophil zu Dihydropyridazinen bzw. Pyridazinen.

Die eher langsam reagierenden Acetylene bzw. Alkine reagieren unter Verlust von Stickstoff zu Pyridazinen (Abbildung 40 A). Alkene reagieren je nach vorhandenem Substituenten zu Dihydropyridazinen (Abbildung 40 B) bzw. nach einer möglichen Eliminierung unter der entsprechenden Re-Aromatisierung ^[94] ebenfalls zu Pyridazinen (Abbildung 40 C). Bei der Verwendung von Norbornen-Derivaten kommt es aufgrund des cyclischen Charakters der Norbornene und einer fehlenden eliminierbaren Gruppierung immer zur Bildung von Dihydropyridazinen (Abbildung 40 B).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Norbornenderivaten (Norb-NBD und Norb-CF) wurden ausschließlich die entsprechenden Dihydropyridazine nach der Reaktion mit den Tetrazinen massenspektrometrisch nachgewiesen. Die Verwendung der beiden Styrenderivate ([2-Methoxyethenyl]-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamid und 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-prop-2-yn-1-ylharnstoff) führte erwartungsgemäß ausschließlich zu den entsprechenden Pyridazinderivaten, da die Addukte aus Styren und Tetrazin eine eliminierbare Methoxygruppierung enthalten.

Produktbildung

Die Modellreaktionen für die inverse Diels-Alder Reaktion unter Einsatz unterschiedlicher Diene bzw. Dienophile (siehe Abschnitt 5.7.1) sollten unter anderem zeigen, welche Dien-Dienophilepaare geeignet sind, um einen möglichst hohen Eduktumsatz zu erreichen. Dieser hängt hauptsächlich von den elektronischen Eigenschaften der Edukte aber auch von deren verwendeten Konzentrationsverhältnissen ab.

An der Reaktivität des reaktivsten Dienophils lässt sich die Reaktivität der einzelnen Tetrazinderivate ablesen bzw. einordnen (Abschnitt 5.7.1;). Eine herabgesetzte Reaktivität, vor allem gegenüber den ebenfalls getesteten Styrenderivaten, zeigt das Tetrazinylphenol-Derivat. Dies ist mit den Elektronendonoreigenschaften des Phenols zu erklären. Substituiert man hingegen das phenolische Proton mit einer elektronenziehenden Funktionalität wie dem Dansylrest, so erhöht sich die Reaktivität gegenüber den Styrenen, wie erwartet, erheblich (Abbildung 23). Wie Abbildung 23 außerdem zu entnehmen ist, führt ausschließlich die Verwendung des Norbornenderivates Norb-NBD zu hohen Ausbeuten in Verbindung mit allen verwendeten Tetrazinen (*N*-(2-Azidoethyl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid, 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol, Dansyltetrazin mit [2-Methoxyethenyl]-*N*-(propinyl)benzamid). Betrachtet man nun die übrigen verwendeten Dienophile *N*-[2-Methoxyethenyl]-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide und 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-prop-ynylharnstoff, so fällt auf, dass diese bezüglich ihrer Ausbeute an Cycloadditionsprodukt im Fall der Verwendung der reaktiveren Tetrazinderivate Dansyltetrazin und (*N*-(2-Azidoethyl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid keine signifikanten Unterschiede zeigen (Abbildung 23; 1, 2; A, C). Im Fall des Tetrazinylphenols führt die Verwendung des harnstoffsubstituierten Methoxyethenylderivats zu einer leicht erhöhten Ausbeute von 3-6% (Abbildung 23, 2, B); somit konnte durch die eingeführte Harnstofffunktionalität die Reaktivität der Doppelbindung bezüglich der inversen Diels-Alder Reaktion leicht gesteigert werden. Neben der sorgfältigen Auswahl des Dienophils mit möglichst optimalen elektronischen Eigenschaften zur inversen Diels-Alder Cycloaddition spielt auch die Wahl des passenden Konzentrationsverhältnisses zwischen Dien und Dienophil eine Rolle. Unter idealen Umständen sollte je ein Äquivalent Dien mit je einem Äquivalent Dienophil reagieren. Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, gibt es bezüglich des Umsatzes und der daraus resultierenden Ausbeute erhebliche Unterschiede, die auf die Stöchiometrie der eingesetzten Edukte zurückzuführen sind. Die Modellreaktionen zeigen, dass die Verwendung eines Überschusses des Tetrazinderivates zu höheren bzw. vollständigen Umsätzen im Falle des Norb-NBD führt (Abbildung 23; 3, A, B, C). Möglicherweise ist die Begründung hierfür in der Instabilität der Tetrazinderivate in wässrigen Medien zu suchen, so dass durch die Verwendung eines Überschusses an Dien genügend reaktives Tetrazin für einen vollständigen Eduktumsatz zur Verfügung steht. Eine ähnliche Tendenz wird auch bei Verwendung der Styrenderivate beobachtet; auch hier führt ein Überschuss des Diens zu einer leicht erhöhten Ausbeute (Abbildung 22; 1, 2; A). Im Fall der Verwendung von Dansyltetrazin als Dienkomponente in Kombination mit 1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-prop-ynylharnstoff wurde

jedoch eine höhere Ausbeute bei Verwendung eines Überschusses des Dienophils beobachtet (Abbildung 23; 2, C).

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass bei der Verwendung des optimalen Verhältnisses von Dien zu Dienophil in Kombination mit einem elektronenreichen Alken eine quantitative Produktausbeute erreicht werden kann. Generell wurde festgestellt, dass Norbornenderivate im Vergleich zu den getesteten Styrenen einen quantitativen Eduktumsatz bei Verwendung eines Überschusses an Tetrazin ermöglichen. Darüber hinaus hat sich am Beispiel der Modifizierung der Tetrazin-modifizierten Antikörperfragmente F_{ab} -Anti-TNF α und F_{ab} -Anti-Her2 gezeigt, dass auch ein Überschuss an Norbornen-Derivat zu einem quantitativen Umsatz führen kann (siehe Abschnitte 5.6.2 und 5.6.3).

Optimierung der Reaktion zwischen Styrenen und Tetrazinen

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, können unter Verwendung von Norbornenen als Dienophile in Verbindung mit unterschiedlichen Tetrazinderivaten quantitative Ausbeuten bzw. Eduktumsätze erreicht werden. Das verwendete Norbornenderivat kann dabei beliebig modifiziert vorliegen. Es ist sowohl eine Derivatisierung mit einem Chromogen wie dem verwendeten NBD als auch mit einem Peptid möglich, wobei die eingeführte Modifizierung keinen Einfluss auf die Reaktivität hat. Um die Reaktivität der Styrenderivate gegenüber den dargestellten Tetrazinen zu verbessern, wäre es sinnvoll, weitere aktivierende Elektronendonorsubstituenten wie Enamine oder Thioether einzuführen^[94].

Produktverteilung

Wie bereits einleitend beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.4.1), kommt es bei der Diels-Alder Reaktion zur Bildung von Isomergemischen; dies gilt sowohl für die Diels-Alder Reaktion mit normalem Elektronenbedarf als auch für die Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf.

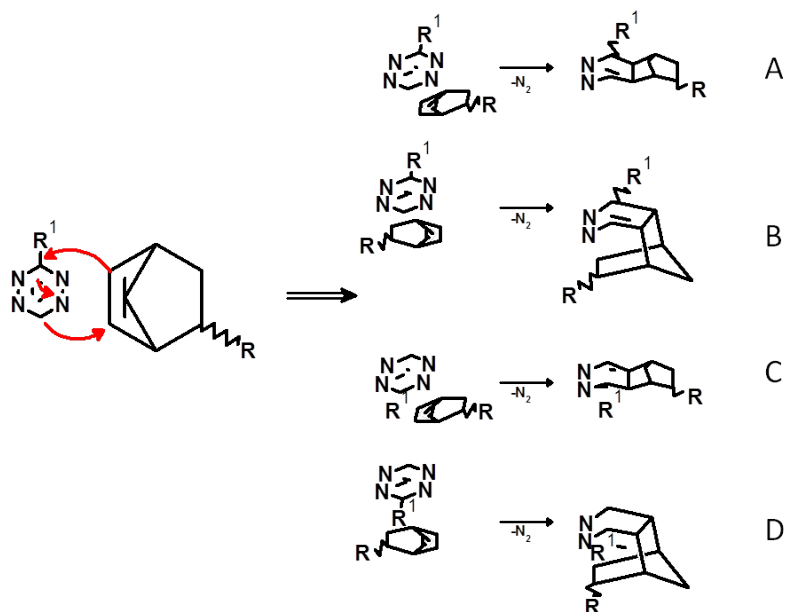


Abbildung 41. Reaktionsschema zur Bildung unterschiedlicher Produkte bei der Reaktion eines Tetrazinderivats mit einem cyclischen Alken. Bei A und C entstehen exo Addukte. Bei B und D entstehen endo Addukte.

Dies ist auf die Bildung von endo- bzw. exo-Addukten und deren Regioisomere zurückzuführen, welche durch die Verwendung eines endo/exo Gemischs des Norbornens entstehen. Des Weiteren werden Regioisomere durch die verschiedenen Möglichkeiten bezüglich der unterschiedlichen relativen Anordnungen von Dien zu Dienophil zueinander gebildet (Abbildung 41).

6.2.3. KUPFERKATALYSIERTE KLICK-REAKTION

Bei der sogenannten Klick-Reaktion handelt es sich, wie bereits einleitend beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.4.4), um eine Cu(I)-katalysierte Cycloaddition zwischen Aziden und terminalen Alkinen. Als Kupferspezies werden hierbei entweder direkt Cu(I)-Salze verwendet ^[153] oder diese durch *in situ* Reduktion mit Ascorbinsäure aus Cu(II)-Salzen erzeugt ^[105]. Sowohl die Verwendung von Kupfersalzen als auch von Ascorbinsäure führen zu Nebenreaktionen an Biomolekülen. So ist bereits bekannt, dass die oxidierte Form der Ascorbinsäure, das Dehydroascorbat, über einige Zwischenschritte Reaktionen mit Lysin und Argininresten in Proteinen eingeht ^[154]. Zudem handelt es sich bei Ascorbinsäure um ein sehr reaktives Elektrophil, welches leicht Cysteinreste modifizieren kann. Des Weiteren reagiert Ascorbinsäure mit Sauerstoff unter Bildung von Dehydroascorbat und Wasserstoffperoxid ^[155], welches in Gegenwart von Cu^+ zu $\cdot\text{OH}$ (Hydroxylradikal) und OH^- zerfällt ^[156]. Die Hydroxylradikale ihrerseits reagieren dann mit oxidationsempfindlichen Aminosäuren des zu modifizierenden Proteins wie Methionin oder Tyrosin ^[157]. Die Bildung von Aminosäureradikalen kann zudem zu einer Quervernetzung der Proteine führen. Da Ascorbinsäure jedoch sehr effizient in der Lage ist, Cu(II) zu Cu(I) zu reduzieren und im Gegensatz zu TCEP nicht vermag, Azide zu reduzieren und ebenso wenig die Klick-Reaktion inhibiert, bleibt dieses Reduktionsmittel alternativlos zumindest für die meisten Anwendungen in der wässrigen „Klick-Chemie“. Denkbar wäre auch die Verwendung von elementarem Kupfer als Reduktionsmittel in Verbindung mit Biomolekülen, welches im Zuge einer Komproportionierung in Verbindung mit Cu(II) Cu(I) entstehen lässt und somit die Rückreaktion der Disproportionierung von Cu(I) darstellt. Vorversuche am Protein (Daten nicht gezeigt) haben jedoch gezeigt, dass die Verwendung von elementarem Kupfer zum Aktivitätsverlust des zu modifizierenden Proteins führt. Zudem können einige Additive wie Aminoguanidin reaktive Spezies, die aus Ascorbinsäure entstanden sind, abfangen ^[105]. Das Entgasen der verwendeten Puffer sorgt darüber hinaus für einen geringeren Sauerstoffgehalt in den verwendeten wässrigen Lösungen und minimiert Nebenreaktionen, die durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht werden.

Zur Stabilisierung der Cu(I)-Spezies werden Liganden wie TBTA oder THPTA (wasserlöslich) verwendet, welche zusätzlich das Präzipitieren der zu modifizierenden Proteine verhindern ^[158].

Darüber hinaus kann auch das zur „Klick-Reaktion“ verwendete Alkin einen Einfluss auf den Verlauf von Klick-Reaktionen haben. So kommt es im Speziellen bei der Verwendung von Pentinsäurederivaten zur Bildung von Nebenprodukten ^[159], die aber nur dann auftreten, wenn freie Pentinsäuren verwendet werden.

Zur Ermittlung einer adäquaten Methode zur klick-chemischen Modifizierung von Proteinen wurden im Rahmen der ausgewählten Modellreaktion zwischen 2-Pentin-1-ol und Dansylazid Reaktionsbedingungen bezüglich des zur Reduktion notwendigen CuSO_4 optimiert (Abschnitt 5.7.2; Tabelle 11).

Neben unterschiedlichen Reduktionsmitteln (Na-Ascorbat, TCEP, Glutathion, KI; Tabelle 11) wurden auch die Additive THPTA und Aminoguanidin verwendet. Hierzu stellen Na-Ascorbat und TCEP die bislang gängigsten Reagenzien zur Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) dar. Bei alleiniger Verwendung von GSH (red.) als Reduktionsmittel entstand kein Cycloadditionsprodukt (Tabelle 11). Bei alleiniger Verwendung von KI als Reduktionsmittel kam es ebenso zu keiner Produktbildung (Tabelle 11). Die

Verwendung von TCEP führt in keinem der untersuchten Fälle zur Ausbildung eines Cycloadditionsproduktes (Tabelle 11). Demnach bleibt die Verwendung von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel zur *in situ* Herstellung von Cu(I) alternativlos. Nähere Untersuchungen hierzu wurden jedoch nicht durchgeführt.

6.3. CHEMISCHE MODELLREAKTIONEN AM PROTEIN

6.3.1. INVERSE DIELS-ALDER REAKTION

Nachdem die Eigenschaften des Tetrazins bezüglich der Diels-Alder Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf schon sehr lange bekannt sind ^[91] und diverse Tetrazinfunktionalitäten (symmetrisch/unsymmetrisch) auf deren Reaktivität gegenüber Dienophilen getestet wurden, wird die Reaktion auch an Biomolekülen wie den Proteinen zur Modifizierung verwendet. Dabei wird i.d.R. entweder das Dienophil ^[136, 137, 160, 161] oder das Dien ^[160] mittels einer unspezifischen Kupplungsreaktion über Succinimidylester ^[160] oder ein Maleinimidderivat ^[136] in das zu modifizierende Protein eingebracht. Diese so eingeführten chemischen Anker werden dann mit Hilfe von Dienen oder Dienophilen mit einer entsprechend hohen Ausbeute chemoselektiv modifiziert. Eine regiospezifische Modifizierung am Protein kann mit dieser Methode jedoch nicht erreicht werden.

Basierend auf den synthetisch relevanten Verhältnissen bzw. Konzentrationen aus Dien und Dienophil (siehe 5.7.1) wurden im Zuge der Modellreaktionen enzymatisch mit Tetrazin- bzw. Norbornenderivaten modifizierte Antikörperfragmente (F_{ab}-Anti-Her2 und F_{ab}-Anti-TNF α) chemoselektiv mit Hilfe der Diels-Alder Reaktion modifiziert (siehe Abschnitt 5.8.3.1). Hierbei ist die Lage der zu modifizierenden Spezies am Protein zunächst nicht relevant; so war es ebenfalls möglich N-terminal modifizierte Proteine wie Norb-RH-CyP18-OH mittels einer inversen Diels-Alder Reaktion mit den entsprechenden Tetrazinderivaten zu modifizieren (siehe Abschnitt 5.8.2.3).

Als Tetrazinderivate wurden *N*-(2-Azidoethyl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid, Methoxy-PEG-Benzoyltetrazin und Dansyltetrazin verwendet. Als Norbornenderivate kamen Norb-NBD, Norb-CF, Norb-OGp und Norb-DM1 zum Einsatz. Die Ausbeute der inversen Diels-Alder Reaktion betrug sowohl am Modellpeptid als auch am Protein nahezu 100% (siehe Abschnitt 5.8).

Somit bietet die Kombination aus enzymatischer *N*- und *C*-terminaler Modifizierung und einer sich daran anschließenden chemischen Markierung zur ortsspezifischen Modifizierung von Proteinen die höchstmögliche Syntheseeffizienz, die erforderliche Regiospezifität und eine enorme Vielseitigkeit an Modifizierungsmöglichkeiten durch die mögliche Verwendung der Diene/Dienophile im Baukastensystem.

Hinsichtlich der Aufreinigung der chemisch modifizierten Antikörperkonstrukte konnte Separation der unterschiedlichen F_{ab}-Spezies im Acetonitril/Wasser Gradienten mittels reverser Phase Chromatographie (RP18) nicht überzeugen; eine Trennung der modifizierten Spezies von nicht modifizierten Spezies war hier nicht möglich. Abhilfe konnte hier die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) schaffen. Diese erlaubt eine vollständige Abtrennung der in der Regel nach einer chemischen Klick-Reaktion hydrophoberen Antikörperspezies. Diese Methode wird häufig zur analytischen Beurteilung von ADCs („*antibody drug conjugates*“ bzw. „*Antikörper-Wirkstoff-Konjugate*“) verwendet und erlaubt Rückschlüsse auf die Anzahl der Modifizierungen pro mol Antikörper (DAR: drug-antibody ratio) ^[162]. Eine Aufreinigung der entsprechenden Derivate ist mit dieser Methode ebenfalls möglich.

Vergleicht man nun die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit der aktuellen Literatur, so bestätigen sich die hier gemachten Beobachtungen. Kurver *et al.* haben diverse Tetrazinderivate synthetisiert, die dann in einer Modellreaktion mit TCO (Transecycloocten) als Dienophil getestet wurden. Dabei stellte sich heraus, dass Benzoyltetrazin sowohl was die Reaktionskinetik als auch die Stabilität angeht wesentlich geeigneter als andere verwendete Tetrazinderivate ist ^[161].

6.3.2. 1,3-DIPOLARE CYCLOADDITION: „KLICK-REAKTION“

Mit Hilfe der „Klick-Reaktion“ konnten bereits biologisch relevante Proteine wie das Kuhpockenmosaikvirus (CPMV) ^[158] oder eine Variante des cysteinfreien Proteins „Barstar“ modifiziert werden ^[163]. Hierzu wurden standardmäßig chemische Methoden zur Einführung der Azid- bzw. alkinreaktiven Spezies verwendet. Der limitierende Faktor bei der Markierung bzw. Modifizierung von Proteinen liegt in der Regel nicht, wie bereits einleitend beschrieben, in der Möglichkeit der Einführung unterschiedlicher Modifikationen sondern bei deren regiospezifischen Einführung. Hierzu wurden bereits einleitend einige Verfahren beschrieben, oftmals enzymatische Methoden, die die enzymatische Reaktion mit der eigentlichen chemischen „Knüpfungsreaktion“ verbinden.

Im Fall des „Barstar“-Proteins wurde die SPI-Methode (siehe Abschnitt 1.2.3.) zur Einführung eines Alkins (Homopropargylglycin, Hpg) verwendet. Diese Methode verläuft zwar regiospezifisch, ist jedoch nur mit einer geringen Ausbeute aufgrund der limitierten Akzeptanz des Aminosäureisosters möglich. Die chemische Einführung der Azid- bzw. Alkin-Anker verläuft nicht positionsspezifisch; somit erübrigt sich die Klick-Reaktion gewissermaßen und könnte ebenso gut durch andere Methoden ersetzt werden.

Ebenso als problematisch stellt sich die Einführung eines reaktiven Ankers am Protein IL-8 zur Alkin-Nitron Cycloaddition dar ^[164]; bei dieser Form der Cycloaddition handelt es sich um eine Variante der klassischen Klick-Reaktion. Hier reagieren *in situ* aus Serin erzeugte Nitrone mit Cyclooctinderivaten. Prinzipiell ist hier zwar eine sowohl regiospezifische als auch chemoselektive und somit orthogonale Modifikation möglich, jedoch erweist sich diese Methode als aufwendig und durch das Auftreten reaktiver Zwischenprodukte (bei Oxidation des Serins zur Bildung des Nitrons entsteht ein Aldehyd als Zwischenprodukt) als wenig praxistauglich. Übergangsmetalle als Katalysator sind bei dieser Methode nicht notwendig. Ebenfalls ohne Übergangsmetallkatalyse erlaubt die SPAAC („strain promoted azide alkyne cycloaddition“) die Bildung cyclischer Addukte aus „gespannten“ Alkinen und Aziden ^[165-169]. Dabei sind, vergleichbar mit der Alkin-Nitron Cycloaddition, oftmals elektronenakzeptorsubstituierte, cyclische Alkinerivate aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften als Dipolarophil bzw. Dienophil notwendig. Somit unterscheidet sich diese Reaktion erheblich von der kupferkatalysierten Klick-Reaktion, bei der ein terminales Alkin benötigt wird, wohingegen bei der kupferfreien Cycloaddition (SPAAC) zwischen Alkinen und Aziden auch interne Alkine verwendet werden können. Allerdings verläuft die unkatalysierte Dipoladdition nicht regioselektiv und produziert somit sowohl 4- als auch 5-Addukte in statistischer Verteilung. Im Weiteren nachteilig wirkt sich die mitunter sehr aufwendige Synthese der oftmals sehr hydrophoben akzeptorsubstituierten internen Alkine auf die Anwendbarkeit dieser Methode aus.

Wie bereits unter 1.2.4.3. beschrieben stellt die Klick-Reaktion gewisse Anforderungen; sie funktioniert nur zuverlässig mit Cu(I) als Katalysator und unter Sauerstoffausschluss. Abhängig von der Anwendung sind hier unterschiedliche Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran, Acetonitril oder auch Wasser möglich.

Für die Klick-Reaktionen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, kam Wasser als Lösungsmittel zum Einsatz. Als Katalysator wurde CuSO_4 verwendet, welches mit Hilfe von Ascorbinsäure reduziert wurde. Als Cu(I)-stabilisierender Ligand wurde entweder TBTA oder THPTA verwendet; zum Abfangen reaktiver Ascorbinsäurespezies diente Aminoguanidin.

Zur Klick-chemischen Modifizierung des enzymatisch modifizierten Modellpeptids PS-RHAK mit Dansylethylazid (siehe Abschnitt 5.8.1) wurde ein gepuffertes wässriges Medium verwendet, welches 20% DMF (v/v) zur Lösung von TBTA enthielt. Die Ausbeute der Klick-Reaktion lag bei 100%.

Im nächsten Schritt sollten enzymatisch *N*-terminal modifizierte Enzyme klick-chemisch modifiziert werden (siehe Abschnitt 5.8.2.). Um das Protein nativ in Lösung zu halten, sollte möglichst wenig DMF bzw. DMSO verwendet werden; da nicht nur das verwendete organische Lösungsmittel Dimethylformamid (DMF) zur Denaturierung von Proteinen führen kann, sondern auch das zur Klick-Reaktion notwendige Kupfer (in den Oxidationsstufen +I und +II) ^[170]. Die Gegenwart von Kupfer führt zur Bildung von Kupfer-Protein Komplexen, welche dann zum Präzipitieren des Zielproteins führen. Um dies zu umgehen, wurde ein Ligand entweder in löslicher Form oder an einem Träger gebunden verwendet. Als wasserlöslicher Ligand kam THPTA zum Einsatz. Als immobilisierter Ligand wurde Nitrilotriessigsäure verwendet. Der Ligand hat zudem die Aufgabe, Cu(I) vor der Reoxidation zu Cu(II) oder der Disproportionierung zu Cu (II) und metallischem Kupfer (Cu) zu schützen. Zudem soll die Komplexbildung von Kupfer einer Denaturierung des zu modifizierenden Proteins vorbeugen. Im Gegensatz zu dem löslichen Liganden erleichtert die Verwendung eines immobilisierten Liganden zudem die Entfernung von Kupferionen aus der proteinhaltigen Lösung.

Die Klick-Reaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig an einem mit Nitrilotriessigsäure funktionalisierten polymeren Träger durchgeführt. Mit Hilfe des mit Cu(I) beladenen immobilisierten Liganden Nitrilotriessigsäure konnten die enzymatisch modifizierten Proteine *hPin1*, *hCyclophilin18* und *E. coli* Parvulin10 regiospezifisch und chemisch vollständig modifiziert werden (siehe Abschnitt 5.8.2.1 Abbildung 25). Somit kann erstmalig gezeigt werden, dass eine ligandengestützte, kupferkatalysierte Huisgen-Dipoladdition am polymeren Träger mit quantitativer Ausbeute durchführbar ist. Dabei kommen die Vorteile eines immobilisierten Liganden in vollem Umfang zum Tragen; durch den Liganden Nitrilotriessigsäure gebundenes Cu(I) kann durch einen Zentrifugationsschritt entfernt werden und stört somit nachfolgende Reaktionen nicht. Des Weiteren ist keine chromatographische Entfernung des Liganden notwendig. Ebenfalls vollständig gelang die Modifizierung der regioselektiv bereits enzymatisch mit 4-Pentinsäure modifizierten Proteine PS-RH-*hPin1*-OH und PS-RH-CyP18-OH mit Dansylazid unter Einsatz des Liganden THPTA. Hier konnte zudem anhand einer „Fluoreszenzfärbung“ der gelelektrophoretisch getrennten Proteine gezeigt werden, dass die modifizierten Proteine vollständig mit dem Fluoreszenzfarbstoff modifiziert sind (siehe Abschnitt 5.8.2.2 Abbildung 26). Diese Kombination aus enzymatischer und chemischer Modifikation stellt ein Novum dar, da es diese Methode im Vergleich zu den bereits vorgestellten Methoden ermöglicht, beliebige Mengen an Protein regioselektiv und chemospezifisch zu modifizieren.

6.3.3. ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DER *N*- UND *C*-TERMINAL MODIFIZIERTEN

PROTEINE

Die Funktionalität des exemplarisch verwendeten Strep-YRH-*hCyP18* sollte im Rahmen eines PPIase-Assays nach erfolgter chemischer Reaktion an diesem Protein überprüft werden. Gewählt wurden

hierfür sowohl die kupferkatalysierte Klick-Reaktion in Lösung als auch die kupferfrei verlaufende inverse Diels-Alder-Reaktion (siehe Abschnitt 5.9). Entsprechend dieser Ergebnisse kann im Analogieschluss davon ausgegangen werden, dass die Kombination aus enzymatischer und chemischer Modifizierung einen vergleichbaren Einfluss auf die Aktivität und Funktionalität entsprechend funktionalisierter Proteine (*E. coli* Parvulin10, *hPin1*, F_{ab}-Anti-Her2) ausübt. Hierbei hat sich herausgestellt, dass, unabhängig von dem verwendeten Additiv, für *hCyP18* nach der chemischen Modifizierung in Gegenwart von einwertigem Kupfer und Na-Ascorbat keine enzymatische Aktivität mehr nachweisbar ist. Dass nicht ausschließlich Kupfer für die Inaktivierung verantwortlich ist konnte gezeigt werden, indem zum einen der Cu^{II}/THPTA-Komplex und zum anderen Cu^{II}/THPTA/Na-Ascorbat mit Strep-YRH-CyP18-OH inkubiert wurden (siehe Abschnitt 5.9.1; Tabelle 13). Diese Daten zeigen, dass komplexierte Kupferspezies, im Gegensatz zum freien Kupfersulfat, keinen Einfluss auf die Aktivität von Cyclophilin haben. Wird jedoch Cu^{II} zu Cu^I mit Hilfe von Na-Ascorbat reduziert, so verliert Cyclophilin seine enzymatische Aktivität vollständig. Dies könnte einerseits mit den unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten von Cu^I und Cu^{II} zusammenhängen; andererseits ist denkbar, dass Na-Ascorbat auch hier eine Rolle spielt, da die reaktiven Zwischenprodukte ausgehend von Na-Ascorbat ebenfalls für eine Inaktivierung in Frage kommen. Im Gegensatz zu einer Inaktivierung durch eine auftretende Proteindenaturierung durch Kupferionen wäre eine entsprechende Inaktivierung durch radikalische Nebenprodukte des Na-Ascorbats kovalenter Art und könnten somit massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Da in keinem der Fälle ein solches Nebenprodukt gefunden wurde (siehe Abschnitt 5.8.2.1; Abbildung 25) kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Cu^I entweder in komplexierter oder „freier“ Form einen maßgeblichen Anteil an der Proteindenaturierung trägt. Der genauen Ursache der Proteindenaturierung während einer kupferkatalysierten Klick-Reaktion wurde im Einzelnen jedoch nicht nachgegangen.

Eine Methode, bei der es nicht zur unerwünschten Denaturierung von Proteinspezies kommt wurde in der inversen Diels-Alder Reaktion gefunden. Diese [4+2]-Addition verläuft nahezu quantitativ (Abbildung 27) ohne Verlust der enzymatischen Aktivität des Zielproteins (siehe Abschnitt 5.9.1; Tabelle 12). Hierbei spielt auch die Reihenfolge der Einführung der jeweiligen reaktiven Spezies (Tetrazin oder Norbornen) keine Rolle. Im Falle der Modifizierung von CyP18 (siehe Abschnitt 5.8.2.1) wurde zunächst die Norbornen-Funktionalität (Norb-OGp) enzymatisch in das Enzym eingeführt woraufhin diese mit einem Tetrazin-Derivat chemisch modifiziert wurde. Im Gegensatz hierzu wurden F_{ab}-Anti-TNF α bzw. F_{ab}-AntiHer2 zunächst mit einem Tetrazin-haltigen Peptid enzymatisch modifiziert, um in einem weiteren Schritt mit dem Norbornen-Derivat chemisch modifiziert zu werden. Beide Vorgehensweisen sind in Bezug auf die Funktionalität (siehe Abschnitt 5.9.2; Abbildung 33) und die aus der Reaktion resultierenden Ausbeuten (Abbildung 30; Abbildung 29) absolut gleichwertig; beide verliefen quantitativ und führten zu funktionalen Produkten.

6.5. METHODEN DER PROTEINMODIFIKATION IM VERGLEICH

Einleitend wurden bereits einige Methoden zur regioselektiven Modifizierung von Proteinen mit Hilfe enzymatischer Verfahren skizziert (s. Einleitung). Erst durch den nachfolgenden, chemoselektiv verlaufenden Modifikationsschritt, der im Fall der Biotin-Ligase und des Formylglycin erzeugenden Enzyms obligatorisch ist, wird das gewünschte „Proteinderivat“ vollständig modifiziert. Im Fall der Sortase-, der Protease- und der durch Transglutaminase-katalysierten Modifizierung von Proteinen ist ein solcher chemischer Schritt zur vollständigen Modifizierung methodisch nicht zwingend; er erlaubt

jedoch die Modifizierung von Proteinen nach dem Baukastenprinzip und ermöglicht somit größtmögliche Varianz der verwendbaren Modifikationsagentien.

Demnach stehen sich fünf mögliche enzymatische Proteinmodifikationsstrategien gegenüber, bei der jede einzelne ein vollständig modifiziertes Protein zur Folge hat. Im Folgenden sollen die gängigsten Methoden miteinander verglichen werden.

6.5.1. BIOTIN-LIGASE, SORTASE, TRANSGLUTAMINASE UND FORMYLGLYCIN-

GENERIERENDES ENZYM IM VERGLEICH MIT TRYPSILIGASE

Das *E. coli* Enzym BirA katalysiert die Biotinylierung einer Lysinseitenkette innerhalb einer 15 Aminosäuren langen Konsensussequenz, dem Akzeptorpeptid. Kofaktor der Biotin-Ligase ist Biotin. Biotin wurde in dieser Methode zur Modifizierung von Proteinen durch ein Isooster^[52, 171] ersetzt, um es nach der enzymatischen Ligation an das Akzeptorpeptid als Anker für weitere Modifikationen (meist über die Bildung eines Hydrazons) nutzen zu können. In Abhängigkeit von der Biotin-Ligase können unterschiedliche Biotin-Isostere wie Ketone, Azide oder Alkine verwendet werden. Nach der enzymatischen Ligation können bzw. müssen diese (chemoselektiv) weiter modifiziert werden. Diese Modifizierungsreaktion wird sowohl zur Aufreinigung von Proteinen^[172], zur Immobilisierung^[173] als auch zur Markierung von Membranproteinen in Zellkultur mit Farbstoffen^[174] verwendet. Als nachteilig bei dieser Methode erweist sich die aufwendige Synthese der Ketonisostere und darüber hinaus die mit 15 Aminosäuren sehr lange Konsensussequenz. Ferner ist es mit dieser Methode nicht möglich, Proteine in einem Schritt zu markieren, da erst die chemische Derivatisierung des Biotin Isosters zu einem vollständig modifizierten Protein führt; es sind also zwingend zwei Schritte zur vollständigen Modifizierung notwendig. Die durch Biotin-Ligase katalysierte Modifizierung von Proteinen kann sowohl am C- als auch am N-Terminus eines Proteins erfolgen^[175]. Da diese Reaktion zumeist genutzt wird, um Proteine *in vivo* zu modifizieren, wurden die Ausbeuten des enzymatischen Teils der Reaktion nicht bestimmt. Bei *in vitro* Experimenten mit isolierter Biotin-Ligase unterschiedlicher Spezies^[171] werden in der aktuellen Literatur ebenfalls keine Effizienzen angegeben.

Das Formylglycine-generierende Enzym (FGE) oxidiert Cysteinreste innerhalb einer Konsensussequenz bestehend aus fünf Aminosäuren zu Formylglycin (Aldehydfunktionalität)^[176]. Nativ enthalten sind diese Konsensussequenzen in Sulfatasen, welche durch das FGE in ihre aktive Form konvertiert werden. Diese Aktivität kann darüberhinaus zur regiospezifischen Einführung von Aldehydfunktionalitäten in beliebige Proteine genutzt werden. Das so erhaltene Formylglycin kann dann in einer weiteren, chemoselektiven Reaktion mit Hydroxylaminderivaten zu Oximen (oder mit Hydrazinderivaten zu Hydrazonen) und somit zu modifizierten Proteinen umgesetzt werden. Das zur Oxidation der Cysteinseitenkette notwendige FGE wird hierbei mit dem zu modifizierenden Zielprotein coexprimiert. Die Oxidation verläuft mit einer Ausbeute von rund 90% und benötigt sowohl reduzierende Bedingungen (durch Zugabe von DTT oder β -Mercaptoethanol) als auch CuSO_4 zur Ausbildung des FGE-Holoenzym^[177]. Disulfidverbrückte Proteine wie etwa Antikörper und deren Fragmente können mit dieser Methode somit nur mit einer erheblich verminderten Ausbeute modifiziert werden. Die sich an die Oxidation der Cysteinseitenkette zu Formylglycin anschließende Carbonylreaktion zwischen einem Hydroxylaminderivat und der Aldehydfunktionalität (zur Ausbildung von Oximen) erfolgt mit einer Effizienz von rund 70%^[129]. Nachteilig wirkt sich hier neben der langen Reaktionsdauer (24 h) für die chemische Modifikation vor allem die Tatsache aus, dass als Nebenreaktion die Bildung von Azomethinen aus Lysinseitenketten und Formylglycin die

Gesamtausbeute an modifiziertem Zielprotein reduzieren dürfte. Problematisch war zudem die vergleichbar hohe Hydrolysenfälligkeit von Oximen und Hydrazonen in biologischen Systemen. Durch die Einführung der Pictet-Spengler Reaktion zwischen Aminen (modifiziertes N-Alkoxytryptamin) und Formylglycin (innerhalb der Konsensussequenz des zu markierenden Proteins) entstehen jedoch hydrolyseunempfindliche, stabile Oxacarboline, welche das Problem der hydrolytischen Instabilität weitestgehend lösen und die Reaktionszeit merklich verkürzen (auf ca. 12 h) ^[178]. Jedoch wirkt sich die mit einem nicht unerheblichen Aufwand verbundene Eduktsynthese nachteilig auf die praktische Anwendung dieser Methode aus. Aufgrund der sehr kurzen Konsensussequenz und des Umstandes, dass ausschließlich die Seitenkettenfunktionalität eines Cysteinrestes modifiziert wird, kann jedoch die Modifizierung des Zielproteins prinzipiell an jeder beliebigen Position des Zielproteins erfolgen.

Das Enzym Transglutaminase katalysiert die Acyltransferreaktion zwischen der γ -Carbonsäureamidgruppe einer Glutaminseitenkette innerhalb einer 7 Aminosäuren umfassenden Konsensussequenz und der ϵ -Aminogruppe einer Lysin- oder Cadaverinfunktionalität ^[60, 179], wobei die Carbonsäurefunktionalität entsprechend modifiziert vorliegen kann. Transglutaminase-katalysierte Modifikationen von Proteinen können, wie FGE-katalysierte Modifikationen auch prinzipiell an beliebigen Stellen in einem Zielprotein erfolgen. Hierbei ist kein sich anschließender chemischer Schritt erforderlich. Die enzymkatalysierte Reaktion erfolgt mit einer Ausbeute von 70-80% ^[50] innerhalb von 30 Minuten.

Bei der Sortase A handelt es sich um eine Cysteinendoprotease ^[180]. Sie ist ähnlich wie Trypsinase (I u. II) zur Ausbildung von Peptidbindungen befähigt. Diese werden, anders als bei der Trypsinvariante, zwischen Threonin- und Glycinfunktionalitäten bzw. zwischen Threonin- und Alaninfunktionalitäten innerhalb einer Konsensussequenz geknüpft ^[181]. Die fünf Aminosäuren umfassende Konsensussequenz LPXTG wird in einem ersten Schritt zwischen der Threonin- und der Glycinseitenkette (K_S und k_2 siehe Abschnitt 1.2.3.2.1; Abbildung 1) gespalten. Das daraus hervorgehende Acyl-Enzym-Intermediat wird dann entweder durch Wasser (Hydrolyse, k_3 ; Abbildung 1) oder in Gegenwart eines Diglycinderivats als Nukleophil (k_4 ; Abbildung 1) deacyliert (Transamidierung) ^[57]. Im Gegensatz zu den verwendeten Trypsinvarianten, bei denen durch den Einsatz sog. Substratmimetika nicht wieder hydrolysierbare Ligationsprodukte entstehen (siehe Abschnitt 1.2.2.1.3) resultieren aus der Sortase A katalysierten Modifizierung des *N*-Terminus analog der des *C*-Terminus potentielle Spaltstellen, die nach Verbrauch des Nukleophils erneut hydrolysiert werden können. Die Produktausbeuten für die *N*- und *C*-terminalen Modifikationen mittels Sortase A liegen zwischen 65% ^[182] und 90% ^[181]. Die Reaktionsbedingungen unterscheiden sich für die *N*-terminale und die *C*- terminale Modifikation. Für die *C*-terminale Modifikation ist eine Inkubationszeit von 7 h bei 37 °C erforderlich; bei der *N*-terminalen Modifikation genügen zwei Stunden. Der Acyldonor wird im Zuge der *N*-terminalen Acyltransferreaktion in einem 10-fachen Überschuss verwendet; der Acylakzeptor wird im Zuge der Transamidierung (*C*-terminal) in einem 15-fachen Überschuss eingesetzt. Zudem ist es notwendig, die Sortase in äquimolaren Mengen zu dem zu modifizierenden Zielprotein einzusetzen. Trotz der vergleichsweise hohen erzielbaren Ausbeute bei der *C*- und *N*-terminalen Modifizierung wirken sich vor allen Dingen die lange Reaktionsdauer und der nötige, sehr hohe Bedarf an Sortase A sowie die möglichen Nebenreaktionen mit Lysinseitenketten ^[183] und die Reversibilität der *N*-terminalen Modifikationsreaktion nachteilig auf die native Modifikation von Proteinen aus. Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Sortase-katalysierten Ligation von Peptiden konnten jedoch das Problem der Reversibilität der *N*-terminalen Modifikation durch die Verwendung sogenannter Depsipeptide lösen ^[184]. Die Verwendung von Depsipeptiden

fürte in dem beschriebenen Fall zusätzlich zu einer nicht unerheblichen Verringerung des zur Reaktion notwendigen Bedarfs an SortaseA zumindest für die *N*-terminale Reaktion.

Tabelle 17. Zusammenfassender Vergleich enzymatischer Methoden zur Modifizierung von Proteinen

Methode	Modifikationsart	Verlauf	Bedingungen	Zeit	Ausbeute
FGE	Beliebig	enzymatisch+chemisch	CuSO ₄ , red.	h	70-99%
Biotin-Ligase	<i>C</i> -, <i>N</i> -terminal	enzymatisch+chemisch	ATP	h	keine Angaben
Transglutaminase	Beliebig	enzymatisch		min	70-80%
Sortase ^[185-187]	<i>C</i> -, <i>N</i> -terminal	enzymatisch	(Ca ²⁺) ²⁴	h	C-terminal: 60-90% N-terminal ²⁵ : 100%
Trypsilgase I, II	<i>C</i> -, <i>N</i> -terminal	enzymatisch	Zn ²⁺ , Ca ²⁺	min	C-terminal: 33-70% N-terminal: 100%

Die Entscheidung, welche Methode zur Modifikation eines Peptids oder Proteins verwendet werden soll kann nur unter Berücksichtigung der Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden getroffen werden und ist in der Regel nicht eindeutig zu beantworten. Zunächst ist zu klären, ob bioorthogonale Methoden (regiospezifisch und ggf. chemoselektiv) benötigt werden oder die Verwendung nicht-orthogonaler Methoden (nicht regiospezifisch) den Ansprüchen genügen. Die Vorteile bioorthogonaler Methoden überwiegen, wenn durch die Modifizierung Nachteile in Bezug auf die Funktionalität entsprechender Proteine bei nicht regiospezifischer bzw. chemoselektiver Modifizierung zu erwarten sind. Dies ist der Fall bei der Modifizierung von Antikörpern und deren Fragmenten; kommt es zur (teilweisen) Blockierung der Antigen-Bindungs-Region ist mit einer verringerten Affinität des Antikörpers zum Antigen zu rechnen. Hier haben (bio)orthogonale Methoden einen Vorteil gegenüber nicht-orthogonalen Methoden. Bioorthogonale Modifizierungsreaktionen kombinieren i.d.R. enzymatische mit chemischen Methoden und sind in der Lage regiospezifisch und chemoselektiv modifizierte Proteine zu erzeugen (zur Definition siehe 1.2). Bei der Auswahl, in Abhängigkeit des jeweiligen (Modifizierungs-)Zwecks, der am ehesten geeigneten Methode spielen der Modifizierungsmaßstab, Nebenreaktionen, der (zeitliche) Aufwand bis zum vollständig modifizierten Protein (inkl. Aufreinigung des Produkts; Synthese der Edukte), die Anwendbarkeit (Handhabung, Modifizierung *N*-Terminus, *C*-Terminus oder beliebige Position) und die erzielbare Ausbeute u.A. eine Rolle.

Sortase, FGE, Trypsilgase und Transglutaminase sind prinzipiell sowohl im Labor- als auch im industriellen Maßstab anwendbar. Durch die Erfordernis von ATP für die Ligationsreaktion eignet sich die *Biotin-Ligase* weniger für große (industrielle) Maßstäbe und wird daher eher für

²⁴ bei Verwendung einer Ca²⁺-abhängigen Sortase. Es wurden bereits Ca²⁺-unabhängige Sortasen entwickelt

²⁵ Unter Verwendung des Depsipeptids

Modifizierungsreaktionen im Labormaßstab (max. mg) verwendet werden. Eine mögliche Nebenreaktion der Transglutaminase ist die Kreuzreaktivität mit nativen Lysinresten während Sortasen neben der möglichen Sekundärhydrolyse (Produkthydrolyse) ebenfalls zu Dimerisierungen^[188] und einer Kreuzreaktivität mit der ϵ -Aminofunktion von Lysin zeigen^[183]. Während es bei *Trypsiligase* ebenfalls zur Sekundärhydrolyse (Produkthydrolyse) kommt werden keine anderen Kreuzreaktionen weder bei der Transamidierung noch bei der Hydrolyse beobachtet. Bei der Modifizierung durch *FGE* handelt es sich um eine Zwei-Schritt-Reaktion bei der im ersten Schritt Cystein innerhalb einer Konsensussequenz zu Formylglycin unter reduzierenden Bedingungen oxidiert wird. Die reduzierenden Bedingungen führen hierbei zu einem Verlust bei disulfidverbrückten Proteinen; hier ist eine Modifizierung an beliebiger Stelle innerhalb des Zielproteins möglich, während *Sortase* und *Trypsiligase* auf die Termini beschränkt sind. Die Eduktsynthesen für die in einem zweiten Schritt notwendige chemische Modifizierung des Formylglycins sind jedoch mit größerem chemischem Aufwand verbunden als die für *Sortase* und *Trypsiligase*. Die Reaktionszeit für die Modifikationsreaktion liegt für die *Trypsiligase* im Minutenbereich während *FGE* und *Sortase* mehrere Stunden bis zur Vervollständigung der Reaktion benötigen. *FGE* und *Sortase* erzielen hingegen etwas höhere Ausbeuten.

Die Modifizierung von Zielproteinen durch *Trypsiligase* (I u. II) mit den Erkennungssequenzen **RHAX** und **RAHX** erfolgt *N*-terminal jeweils mit einer quantitativen Ausbeute während *Sortase* nur durch Verwendung der aufwendig herzustellenden Depsipeptide ähnliche Ausbeuten unter vergleichbaren Bedingungen erzielt. Bei der *C*-terminalen Modifizierung von Peptiden und Proteinen werden 33%-70% Produktausbeute durch die *Trypsiligase* innerhalb von 20-30 Minuten erreicht (siehe Abschnitt 5.6.1; Abbildung 19); vergleichbar also mit der möglichen Ausbeute der *Sortase*-katalysierten Reaktion jedoch in kürzerer Zeit. Die *Trypsiligase*-Katalyse profitiert hier deutlich von den kurzen Reaktionszeiten und ermöglicht somit in einem höheren Produktdurchsatz (im industriellen Maßstab) als *FGE* oder *Sortase*. Verknüpft man nun die enzymatische Einführung von Linkersequenzen durch *Trypsiligase* mit einer chemoselektiven Klick-Reaktion lassen sich beliebige Modifikationen in Proteine sowohl *C*- als auch *N*-terminal mit hoher Ausbeute in Proteine einführen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung geeigneter Methoden zur kombinierten, enzymatischen und chemischen Modifizierung von Peptiden und Proteinen. Hierzu sollte die im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisierte TrypsiligaseII neben der bereits etablierten Trypsiligase^[69-71] verwendet werden. Mit Hilfe dieser Enzyme sollten reaktive Moleküle in unterschiedliche Zielproteine eingebracht werden, um diese dann in einem weiteren Schritt chemisch zu modifizieren.

Unter acht verschiedenen Trypsinvarianten konnte TrypsiligaseII (Tn K60E/D189K/Y39H/Y59H) als sehr effizient bei der hydrolytischen Umsetzung des Peptides Bz-AAARAHAAG-OH bestätigt werden. Durch einen Vergleich der enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} für die Erkennungssequenzen *Xaa-Tyr-Arg-His-Xaa-Xaa-*, *-Xaa-Tyr-Arg-Xaa-His-Xaa-*, und *-Xaa-Tyr-Arg-Xaa-Xaa-His-* wurde eine zinkioneninduzierte Spezifität der TrypsiligaseII für Histidinfunktionalitäten in der P₃'-Position ermittelt. Die optimale Erkennungssequenz für diese Trypsinvariante lautet somit *-Xaa-Tyr-Arg-Xaa-His-Xaa-*. Neben dieser Trypsinvariante wurde Trypsiligase mit einer zinkionenabhängigen Spezifität für Histidinfunktionalitäten in der P₂'-Position eines Substrats verwendet. Für dieses Enzym lautet die optimale Erkennungssequenz *Xaa-Tyr-Arg-His-Xaa*^[70].

N-terminal modifiziert, unter Verwendung der Trypsiligase, wurden die Zielproteine Strep-YRH-Pin1-OH, Strep-YRH-CyP18-OH und *E.coli* Strep-YRH-Parv10-OH. TrypsiligaseII wurde zur *N*-terminalen Modifizierung von Strep-YRAH-CyP18-YRHAAG-OH verwendet. Die *N*-terminale Modifikation wurde unter Einsatz des Acyldonoresters 4-Pentinsäure-OGp oder Norbornenyl-OGp durchgeführt. Die Syntheseeffizienzen der *N*-terminalen, enzymatischen Modifikationsreaktionen waren unabhängig von der verwendeten Trypsinvariante quantitativ.

Nach einem Vergleich von TrypsiligaseII und Trypsiligase hinsichtlich ihrer Transamidierungseffizienzen wurde ausschließlich Trypsiligase zur *C*-terminalen Modifizierung von Proteinen speziell der Antikörperfragmente F_{ab}-Anti-Her2 und F_{ab}-Anti-TNF α verwendet. In beide F_{ab}-Fragmente konnten enzymatisch jeweils eine Tetrazinfunktionalität mit Hilfe des Peptides H-RHAAC(Tetrazin)-OH bzw. H-RHAC(Tetrazin)-OH eingeführt werden.

Sowohl die zur Proteinmodifizierung verwendeten Esterderivate als auch die eingesetzten Tetrazinderivate wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und auf deren Funktionalität hin mit Hilfe von Modellreaktionen getestet. Die synthetische Darstellung der Modifikationsreagentien zur Validierung sowohl der Reaktionsklassen der inversen Diels-Alder-Reaktion als auch der „Klick-Reaktion“ in Form der funktionalisierten Styren- und Tetrazinderivate erfolgte mit Hilfe klassischer Synthesestrategien. So wurden alle Styrenderivate mit Hilfe der Alkenylierungsreaktion nach Wittig mit guten Ausbeuten hergestellt. Alle Tetrazingrundkörper wurden in einer Eintopfreaktion aus unterschiedlich aktivierten Carbonylkomponenten in Form von Nitrilen, Amidinen oder Imidaten und Hydrazin synthetisiert, welche aufgrund der zahlreichen Reaktionsmöglichkeiten nur mit einer vergleichsweise geringen Ausbeute erhalten wurden.

Die Modellreaktionen beinhalteten die Bewertung der Reaktionsfähigkeit unterschiedlicher Diene und Dienophile zuzüglich der Konzentrationsabhängigkeiten derselben im Rahmen der inversen Diels-Alder Reaktion. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte die Klasse der Norbornene neben der Klasse der Styrene als am geeignetsten für Cycloadditionsreaktion mit Tetrazinderivaten unabhängig von der eingesetzten Konzentration identifiziert werden. Gegenstand weiterer Modellreaktion war der

Einfluss unterschiedlicher Reduktionsmittel wie TCEP, GSH, KI und Na-Ascorbat auf die kupferkatalysierte Cycloaddition (Klick-Reaktion). Die Verwendung von TCEP, GSH und KI führte in keinem Fall zur Ausbildung des gewünschten 1,4-Triazols. Ausschließlich bei Verwendung von Na-Ascorbat konnte das 1,4-Triazol identifiziert werden.

Unter optimierten Bedingungen erfolgte in einem finalen Schritt eine chemische Modifizierung der enzymatisch eingeführten Funktionalitäten der modifizierten Proteine mit Hilfe von bioorthogonalen Cycloadditionsreaktionen.

Die enzymatisch durch 4-Pentinsäure *N*-terminal funktionalisierten Proteine *hCyP18*, *hPin1* und *E.coli* Parv10 wurden in einer [3+2] „Klick-Reaktion“ mit Dansylethylazid unter Ausbildung eines 1,4-Triazols modifiziert. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Reaktionsansätze der Komplexierung der essentiellen Cu(I)-Spezies verfolgt. Zum einen kam erfolgreich ein immobilisierter Ligand in Form einer Nitrilotriessigsäure zur Komplexierung der für diese Reaktion notwendigen Cu(I)-Spezies zum Einsatz. Zum anderen wurde der wasserlösliche Ligand THPTA zur Komplexierung der Cu⁺¹-Spezies genutzt. Beide Varianten dieser Klick-Reaktion führten zu einem quantitativen Umsatz in Richtung eines vollständig chemisch und enzymatisch modifizierten Proteins. Ein durch Norb-OGp modifiziertes *hCyP18* konnte nahezu quantitativ mittels einer inversen [4+2]-Cycloaddition durch Dansyltetrazin modifiziert werden. Sowohl F_{ab}-Anti-Her2 als auch F_{ab}-Anti-TNF α wurden *C*-terminal mit einer Tetrazinfunktionalität versehen und quantitativ mit einem farbstofffunktionalisierten Norbornenderivat (Norb-NBD bzw. Norb-CF) modifiziert.

Die enzymatische Funktionalität der durch unterschiedliche Methoden modifizierten PPIase *hCyp18* wurde mittels eines PPIase-Tests mit Hilfe enzymkinetischer Methoden stellvertretend für alle im Rahmen dieser Arbeit *N*-terminal modifizierten Proteine bestimmt. Dieser Test belegt, dass die kupferkatalysierte Cycloaddition weniger für die native chemische Modifikation am Protein geeignet ist als die inverse Diels-Alder Reaktion zwischen Tetrazin- und Norbornenderivaten ist. Die inverse Diels-Alder Reaktion verläuft ohne Verlust der enzymatischen Aktivität des modifizierten Proteins. Die Funktionalität der modifizierten Fab-Fragmente F_{ab}-Anti-TNF α -RHAAC(CF) und F_{ab}-AntiHer2-RHAC(DM1) konnte ebenfalls nach der Kombination aus enzymatischer und chemischer Modifizierung durch den Vergleich der jeweiligen Bindungskurven vor und nach der Modifikation bestätigt werden.

Die Kombination aus enzymatischer und chemischer Modifikation erhöht somit nicht nur die Diversität der möglichen Modifikationen an einem Protein sondern stellt auch eine verlässliche Methode zur quantitativen und vor allem chemo- bzw. regioselektiven Derivatisierung von Biomolekülen dar.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5,6CF	Isomer aus 5-Carboxyfluorescein und 6-Carboxyfluorescein
AHS	Aminohexansäure
CF	Carboxyfluorescein
Dansyl	5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonyl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
GSH	Glutathion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (high pressure liquid chromatography)
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
Lys(Dde)-OH	N- ϵ -1 - [(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl]-L-Lysin
MS	Massenspektrometrie (mass spectrometry)
NBD	Nitro-Benzoxadiazol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Norb	Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carbonsäure
Norb-AHS	[Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylcarbonyl)amino]hexansäure
Norb-NBD	N-(2-aminoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxamido-NBD
Norb-OGP	[Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylcarbonyl)amino]hexansäure-OGp
NTA	Nitrilotriessigsäure

OGp	4-Guanidinophenol
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PS	Pentinsäure
qu, q, t, d, s	Quintett, Quartett, Triplett, Dublett, Singulett
SC	Synthetic complete
SDS	Natrium Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Strep	Strep-Tag®; Aminosäuresequenz “WSHPQF-Glu-Lys” mit einer Affinität zu Strep-Tactin, einem synthetisch hergestellten Streptavidin ^[189]
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)
TCEP	Triscarboxyethylphosphin
TEA	Triethylamin
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin ^[105]
Trypsiligase(I)	Tn D189K/E151H/N143H/K60E
TrypsiligaseII	Tn D189K/K60E/Y59H/Y39H
UPLC	Ultrahochdruckflüssigchromatographie (ultra pressure liquid chromatography)
YPD	Yeast extract peptone dextrose

9. LITERATUR

- [1] P. Edman, *Acta Chemica Scandinavica* **1950**, 4, 283.
- [2] D. H. Spackmann, W. H. Stein, S. Moore, *Analytical Chemistry* **1958**, 30, 1190.
- [3] P. Edman, G. Begg, *European Journal of Biochemistry* **1967**, 1, 80.
- [4] G. L. Ellman, *Archives in Biochemistry and Biophysics* **1959**, 82, 70.
- [5] G. Schoellmann, E. Shaw, *Biochemistry* **1963**, 2, 252.
- [6] D. G. Hoare, D. E. Koshland, *Journal of Biological Chemistry* **1967**, 242, 2447.
- [7] H. Bouchard, C. Viskov, C. Garcia-Echeverria, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24, 5357.
- [8] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chemical Reviews* **2010**, 110, 2620.
- [9] J. Lofblom, J. Feldwisch, V. Tolmachev, J. Carlsson, S. Stahl, F. Y. Frejd, *FEBS Letters* **2010**, 584, 2670.
- [10] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, F. F. Davis, *Journal of Biological Chemistry* **1977**, 252, 3582.
- [11] A. Constantinou, A. A. Epenetos, D. Hreczuk-Hirst, S. Jain, M. Wright, K. A. Chester, M. P. Deonarain, *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20, 924.
- [12] B. Nediljko, A. Stefan, B. Jae Hyun, G. Ralph, M. Caroline, H. Robert, M. Luis, *Protein Science* **2001**, 10, 1281.
- [13] N. Budisa, S. Alefelder, J. H. Bae, R. Golbik, C. Minks, R. Huber, L. Moroder, *Protein Science* **2001**, 10, 1281.
- [14] N. Budisa, C. Minks, F. J. Medrano, J. r. Lutz, R. Huber, L. Moroder, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, 455.
- [15] C. Minks, S. Alefelder, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9431.
- [16] T. Aumüller, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle (Saale)): Dissertation, **2008**.
- [17] S. Weiss, *Nature Structural and Molecular Biology* **2000**, 7, 724.
- [18] L. S. Barak, W. W. Webb, *The Journal of Cell Biology* **1981**, 90, 595.
- [19] M. Fernandez-Suarez, H. Baruah, L. Martinez-Hernandez, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, A. Y. Ting, *Nature Biotechnology* **2007**, 25, 1483.
- [20] W. P. Heal, S. R. Wickramasinghe, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate, *Organic and Biomolecular Chemistry* **2008**, 6, 2308.
- [21] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *Chemical Biology* **2008**, 3, 373.
- [22] G. V. Los, K. Wood, *Methods in Molecular Biology* **2007**, 356, 195.
- [23] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 6063.
- [24] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269.
- [25] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Accounts of Chemical Research* **2011**, 44, 666.
- [26] C. O. Beauchamp, S. L. Gonias, D. P. Menapace, S. V. Pizzo, *Analytical Biochemistry* **1983**, 131, 25.
- [27] S. Yoshitake, Y. Yamada, E. Ishikawa, R. Masseyeff, *European Journal of Biochemistry* **1979**, 101, 395.
- [28] D. H. Doherty, M. S. Rosendahl, D. J. Smith, J. M. Hughes, E. A. Chlipala, G. N. Cox, *Bioconjugate Chemistry* **2005**, 16, 1291.
- [29] J. M. Antos, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 10256.
- [30] C. Mannich, *Archiv der Pharmazie* **1917**, 255, 261.

- [31] N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15942.
- [32] D. W. Romanini, M. B. Francis, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *19*, 153.
- [33] H. Ban, J. Gavriljuk, C. F. Barbas, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1523.
- [34] J. Trupin, H. Dickerman, M. Nirenberg, H. Weissbach, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1966**, *24*, 50.
- [35] M. V. Simpson, Farber E., H. Tarver, *The Journal of Biological Chemistry* **1950**, *182*, 81.
- [36] D. B. Cowie, G. N. Cohen, E. T. Bolton, H. De Robichon-Szulmajster, *Biochimica et Biophysica Acta* **1959**, *34*, 39.
- [37] S. Schlesinger, *Journal of Biological Chemistry* **1968**, *243*, 3877.
- [38] S. Schlesinger, M. J. Schlesinger, *Journal of Biological Chemistry* **1967**, *242*, 3369.
- [39] A. P. Levin, P. E. Hartman, *Journal of Bacteriology* **1963**, *86*, 820.
- [40] N. Budisa, S. Boris, D. Pascal, E. Christoph, K. Josef, H. Robert, *European Journal of Biochemistry* **1995**, *230*, 788.
- [41] M. Ibba, H. Hennecke, *FEBS letters* **1995**, *364*, 272.
- [42] F. G. Prendergast, K. G. Mann, *Biochemistry* **1978**, *17*, 3448.
- [43] L. Bossi, J. Roth, *Nature* **1980**, *286*, 123.
- [44] J. Ellman, D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, J. L. John, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 202*, Academic Press, **1991**, pp. 301.
- [45] T. Hohsaka, D. Kajihara, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *121*, 34.
- [46] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymański, R. Mueller, M. Wießler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 4166.
- [47] J. Ellman, D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, J. L. John, in *Methods in Enzymology, Vol. 202*, Academic Press, **1991**, pp. 301.
- [48] J. D. Bain, D. A. Wacker, E. E. Kuo, A. R. Chamberlin, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2389.
- [49] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498.
- [50] C.-W. Lin, A. Y. Ting, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 4542.
- [51] S. Fetzner, F. Lingens, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1994**, *58*, 641.
- [52] I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, *Nature Methods* **2005**, *2*, 99.
- [53] M. B. Parrott, M. A. Barry, *Molecular Therapy* **2000**, *1*, 96.
- [54] B. H. Meyer, J.-M. Segura, K. L. Martinez, R. Hovius, N. George, K. Johnsson, H. Vogel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 2138.
- [55] L. Vivero-Pol, N. George, H. Krumm, K. Johnsson, N. Johnsson, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12770.
- [56] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nature Chemical Biology* **2007**, *3*, 707.
- [57] X. Huang, A. Aulabaugh, W. Ding, B. Kapoor, L. Alksne, K. Tabei, G. Ellestad, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11307.
- [58] P. D. Benjamin, Z. Zhiyuan, H. Ayako, D. D. Mark, *A European Journal of Chemical Biology* **2007**, *8*, 98.
- [59] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nature Chemical Biology* **2007**, *3*, 321.
- [60] C. Wolff, C. S. Lai, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3483.
- [61] G. A. Homandberg, M. Laskowski, *Biochemistry* **1979**, *18*, 586.
- [62] V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30*, 1437.
- [63] P. C. Engel, *Biochemical Education* **1981**, *9*, 119.
- [64] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnecke, *Angewandte Chemie* **1985**, *97*, 79.
- [65] K. Rall, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle): Dissertation, **2004**.
- [66] B. S. Hartley, D. M. Shotton, D. B. Paul, in *The Enzymes, Vol. Volume 3*, Academic Press, **1971**, pp. 323.
- [67] F. Bordusa, H. D. Jakubke, US Patent: US 7459526, **2002**.

- [68] L. S. Brinen, W. S. Willett, C. S. Craik, R. J. Fletterick, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5999.
- [69] S. Liebscher, M. Schöpfel, T. Aumüller, A. Sharkhuukhen, A. Pech, E. Höss, C. Parthier, G. Jahreis, M. T. Stubbs, F. Bordusa, *Angewandte Chemie* **2014**, *126*, 3068.
- [70] S. Liebscher, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle a.d.Saale): Dissertation, **2008**.
- [71] S. Liebscher, P. Kornberger, G. Fink, E.-M. Trost-Gross, E. Höss, A. Skerra, F. Bordusa, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1096.
- [72] V. Čeřovský, F. Bordusa, *The Journal of Peptide Research* **2000**, *55*, 325.
- [73] F. Bordusa, D. Ullmann, C. Elsner, H.-D. Jakubke, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36*, 2473.
- [74] R. Günther, F. Bordusa, *Chemistry – A European Journal* **2000**, *6*, 463.
- [75] H. Staudinger, M. Jules, *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, 635.
- [76] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007.
- [77] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [78] M. E. Ourailidou, J.-Y. van der Meer, B.-J. Baas, M. Jeronimus-Stratingh, A. L. Gottumukkala, G. J. Poelarends, A. J. Minnaard, F. J. Dekker, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 209.
- [79] J. Li, S. Lin, J. Wang, S. Jia, M. Yang, Z. Hao, X. Zhang, P. R. Chen, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 7330.
- [80] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2001**, *40*, 2004.
- [81] R. Huisgen, *Pure and Applied Chemistry* **1989**, *61*, 613.
- [82] J. Buddrus, *Grundlagen der organischen Chemie, Vol. 2*, de Gruyter, Berlin, New York, **1990**.
- [83] D. Otto, A. Kurt, *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **1928**, *460*, 98.
- [84] K. Fukui, in *Orientation and Stereoselection*, **1970**, pp. Seite 1.
- [85] K. Fukui, *Accounts of Chemical Research* **1971**, *4*, 57.
- [86] K. Alder, *Experientia Supplementum II* **1955**, 86.
- [87] J. Sauer, D. Lang, A. Mielert, *Angewandte Chemie* **1962**, *74*, 352.
- [88] S. Jürgen, W. Hubert, M. Albrecht, *Chemische Berichte* **1964**, *97*, 3183.
- [89] R. E. Banks, A. C. Harrison, R. N. Haszeldine, K. G. Orrell, *Chemical Communications* **1965**, 41.
- [90] H. Bluestone, R. Bimber, R. Berkey, Z. Mandel, *The Journal of Organic Chemistry* **1961**, *26*, 346.
- [91] J. Sauer, A. Mielert, D. Lang, D. Peter, *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 1435.
- [92] N. K. Devaraj, G. M. Thurber, E. J. Keliher, B. Marinelli, R. Weissleder, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 4762.
- [93] F. Thalhammer, U. Wallfahrer, J. Sauer, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 6851.
- [94] S. Jürgen, K. H. Dieter, H. Josef, K. Josef, S. Heinz, S. Johann, *European Journal of Organic Chemistry* **1998**, *1998*, 2885.
- [95] Z. Li, H. Cai, M. Hassink, M. L. Blackman, R. C. D. Brown, P. S. Conti, J. M. Fox, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 8043.
- [96] H. Stockmann, A. A. Neves, S. Stairs, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 7303.
- [97] K. Alder, W. Foerst, *Neuere Methoden der präparativen Organischen Chemie, Vol. 1*, Verlag Chemie, Berlin, **1943**.
- [98] H. Rolf, S. Günter, M. Leander, *Chemische Berichte* **1967**, *100*, 2494.
- [99] A. Michael, *Journal für Praktische Chemie* **1893**, *48*, 94.
- [100] C. Tornøe, M. Meldal, *Peptidotriazoles: Copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar Cycloadditions on solid-phase*, American Peptide Society and Kluwer Academic Publishers, San Diego, **2001**.
- [101] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057.
- [102] V. Rostovtsev, G. G. Luke, V. F. Valery, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596.
- [103] A. C. L. C. S. P. N. Silvia Díez-González, *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12*, 7558.
- [104] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Organic Letters* **2004**, *6*, 2853.

- [105] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 9879.
- [106] K. Tanaka, C. Kageyama, K. Fukase, *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 6475.
- [107] C. Meyer, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Tübingen): Diplomarbeit, **2006**.
- [108] G. Bertani, *Journal of Bacteriology* **1951**, *62*, 293.
- [109] M. S. S. Katrina H. Jensen, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 9999, NA.
- [110] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680.
- [111] T. Maniatis, J. Sambrook, E. F. Fritsch, L. Cold Spring Harbor, *Molecular cloning : a laboratory manual / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. :, **1982**.
- [112] H. Lineweaver, D. Burk, *Journal of the American Chemical Society* **1934**, *56*, 658.
- [113] G. Fischer, H. Bang, C. Mech, *Biomedica Biochimica Acta* **1984**, *43*, 1101.
- [114] R. M. Lequin, *Clinical Chemistry* **2005**, *51*, 2415.
- [115] T. L. Martin, E. J. Mufson, M. M. Mesulam, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1984**, *32*, 793.
- [116] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1993**, 778.
- [117] J. J. Diaz-Mochon, L. Bialy, M. Bradley, *Organic Letters* **2004**, *6*, 1127.
- [118] M. Schlosser, K. F. Christmann, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1966**, *5*, 126.
- [119] H. Bisswanger, *Enzyme Kinetics*, Wiley-VCH, Tübingen, **2002**.
- [120] S. I. Presolski, V. P. Hong, M. G. Finn, *Curr Protoc Chem Biol* **2011**, *3*, 153.
- [121] S. Hur, T. C. Bruice, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 7303.
- [122] J. R. Junutula, S. Bhakta, H. Raab, K. E. Ervin, C. Eigenbrot, R. Vandlen, R. H. Scheller, H. B. Lowman, *Journal of Immunological Methods* **2008**, *332*, 41.
- [123] S. K. E. Messerschmidt, A. Kolbe, D. Müller, M. Knoll, J. Pleiss, R. E. Kontermann, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *19*, 362.
- [124] T. L. Mindt, V. Jungi, S. Wyss, A. Friedli, G. Pla, I. Novak-Hofer, J. Grünberg, R. Schibli, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *19*, 271.
- [125] T. Takazawa, N. Kamiya, H. Ueda, T. Nagamune, *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, *86*, 399.
- [126] N. Kamiya, T. Takazawa, T. Tanaka, H. Ueda, T. Nagamune, *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *33*, 492.
- [127] T. Gronemeyer, C. Chidley, A. Juillerat, C. Heinis, K. Johnsson, *Protein Engineering Design and Selection* **2006**, *19*, 309.
- [128] F. Kampmeier, M. Ribbert, T. Nachreiner, S. Dembski, F. Beaufils, A. Brecht, S. Barth, *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 1010.
- [129] J. E. Hudak, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. Grob, E. Nogales, C. R. Bertozzi, D. Rabuka, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 4161.
- [130] R. van Geel, M. A. Wijdeven, R. Heesbeen, J. M. M. Verkade, A. A. Wasiel, S. S. van Berkel, F. L. van Delft, *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 2233.
- [131] R. R. Beerli, T. Hell, A. S. Merkel, U. Grawunder, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131177.
- [132] M. A. Olayioye, *Breast Cancer Res.* **2001**, *3*, 385.
- [133] W. J. Sandborn, B. G. Feagan, S. Stoinov, P. J. Honiball, P. Rutgeerts, D. Mason, R. Bloomfield, S. Schreiber, *New England Journal of Medicine* **2007**, *357*, 228.
- [134] S. Stephens, N. Goel, *mAbs* **2010**, *2*, 137.
- [135] A. Mangia, F. Bortesi, U. Amendola, *J.Heterocycl.Chem* **1977**, *13*, 587.
- [136] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518.
- [137] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2297.
- [138] S. A. Lang, B. D. Johnson, E. Cohen, A. E. Sloboda, E. Greenblatt, *Journal of Medicinal Chemistry* **1976**, *19*, 1404.
- [139] S. A. Lang, B. D. Johnson, E. Cohen, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1975**, *12*, 1143.
- [140] H.-J. Degen, S. Haller, K. H. Und, H. Neunhoeffter, *Chemische Berichte* **1979**, *112*, 1981.

- [141] M. Bohle, G. V. Boyd, F. Fischer, K. Friedrich, R. Grashey, F. Hübner, D. T. Hurst, K. Huthmacher, *Heterocycles IV: Six Membered And Larger Heterocycles With Maximum Unsaturation, Vol. E9c*, Houben-Weyl, **1998**.
- [142] E. Golowinsky, *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk* **1962**, *15*, 277.
- [143] W. J. van der Burg, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1955**, *74*, 257.
- [144] H. Neunhoeffer, F. Weischedel, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1971**, *749*, 16.
- [145] A. Pinner, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1897**, *297*, 221.
- [146] K. N. Zelenin, O. V. Solod, V. A. Khrustalev, *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1989**, *25*, 717.
- [147] E. Levanova, V. Grabel'nykh, N. Russavskaya, I. Rozentsveig, O. Tarasova, N. Korchevin, *Russian Journal of General Chemistry* **2011**, *81*, 611.
- [148] J. Sauer, H. Wiest, *Angewandte Chemie* **1962**, *74*, 353.
- [149] J. Sauer, A. Mielert, D. Lang, D. Peter, *Chemische Berichte* **1965**, *98*, 1435.
- [150] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chemical Communications*, *48*, 1736.
- [151] M. G. Barlow, R. N. Haszeldine, J. A. Pickett, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **1978**, 378.
- [152] M. J. Haddadin, S. J. Firsan, B. S. Nader, *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44*, 629.
- [153] S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, H. H. Jensen, S. J. Campbell, J. Kirkpatrick, N. J. Oldham, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Nature* **2007**, *446*, 1105.
- [154] R. H. Nagaraj, D. R. Sell, M. Prabhakaram, B. J. Ortwerth, V. M. Monnier, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 10257.
- [155] B. Gassmann, *Food / Nahrung* **1992**, *36*, 414.
- [156] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, A. N. G. Lester Packer, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 186*, Academic Press, **1990**, pp. 1.
- [157] J. Berges, et al., *Journal of Physics: Conference Series*, *261*, 012003.
- [158] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3192.
- [159] T. L. Mindt, R. Schibli, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 10247.
- [160] H.-S. Han, N. K. Devaraj, J. Lee, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, M. G. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society*, *132*, 7838.
- [161] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 2263.
- [162] A. Wakankar, Y. Chen, Y. Gokarn, F. S. Jacobson, *MAbs* **2011**, *3*, 161.
- [163] L. M. Artner, L. Merkel, N. Bohlke, F. Beceren-Braun, C. Weise, J. Dervede, N. Budisa, C. P. R. Hackenberger, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 522.
- [164] X. Ning, R. P. Temming, J. Dommerholt, J. Guo, D. B. Ania, M. F. Debets, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, F. L. van Delft, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 3065.
- [165] X. H. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G. J. Boons, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2008**, *47*, 2253.
- [166] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 16793.
- [167] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chemical Biology* **2006**, *1*, 644.
- [168] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angewandte Chemie* **2008**, *120*, 2285.
- [169] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 9612.
- [170] J. W. Mehl, E. Pacovska, R. J. Winzler, *Journal of Biological Chemistry* **1949**, *177*, 13.
- [171] S. A. Slavoff, I. Chen, Y.-A. Choi, A. Y. Ting, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 1160.
- [172] F. Grosveld, P. Rodriguez, N. Meier, S. Krcic, F. Pourfarzad, P. Papadopoulos, K. Kolodziej, G. P. Patrinos, A. Hostert, J. Strouboulis, *Annals of the New York Academy of Sciences* **2005**, *1054*, 55.
- [173] M. D. Scholle, F. R. Collart, B. K. Kay, *Protein Expression and Purification* **2004**, *37*, 243.

-
- [174] M. Howarth, K. Takao, Y. Hayashi, A. Y. Ting, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 7583.
- [175] I. Chen, Y.-A. Choi, A. Y. Ting, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 6619.
- [176] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nature Chemical Biology* **2007**, *3*, 321.
- [177] D. York, J. Baker, P. G. Holder, L. C. Jones, P. M. Drake, R. M. Barfield, G. T. Bleck, D. Rabuka, *BMC Biotechnology* **2016**, *16*, 1.
- [178] P. Agarwal, J. van der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *110*, 46.
- [179] T. F. Slaughter, K. E. Achyuthan, T.-S. Lai, C. S. Greenberg, *Analytical Biochemistry* **1992**, *205*, 166.
- [180] A. W. Maresso, R. Wu, J. W. Kern, R. Zhang, D. Janik, D. M. Missiakas, M.-E. Duban, A. Joachimiak, O. Schneewind, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, M701857200.
- [181] J. M. Antos, G.-L. Chew, C. P. Guimaraes, N. C. Yoder, G. M. Grotenbreg, M. W.-L. Popp, H. L. Ploegh, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 10800.
- [182] T. Sakamoto, S. Sawamoto, T. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 2227.
- [183] S. Möhlmann, C. Mahlert, S. Greven, P. Scholz, A. Harrenga, *Chembiochem* **2011**, *12*, 1774.
- [184] D. J. Williamson, M. A. Fascione, M. E. Webb, W. B. Turnbull, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 9377.
- [185] C. P. Guimaraes, M. D. Witte, C. S. Theile, G. Bozkurt, L. Kundrat, A. E. M. Blom, H. L. Ploegh, *Nature Protocols* **2013**, *8*, 1787.
- [186] C. S. Theile, M. D. Witte, A. E. M. Blom, L. Kundrat, H. L. Ploegh, C. P. Guimaraes, *Nature Protocols* **2013**, *8*, 1800.
- [187] H. Hirakawa, S. Ishikawa, T. Nagamune, *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, *109*, 2955.
- [188] T. Heck, P.-H. Pham, A. Yerlikaya, L. Thony-Meyer, M. Richter, *Catalysis Science & Technology* **2014**, *4*, 2946.
- [189] A. Skerra, T. G. M. Schmidt, in *Methods in Enzymology (Academic Press)* **2000**, 326, 271.

10. ANHANG

10.1. ANALYTIK

Norbornen-Carboxyfluorescein

MS (ESI), m/z ber, $C_{31}H_{26}N_2O_7$ (538): 539 $[M+H]^+$.

N-2-{2-[2-((2-Azidoethoxy)ethoxy ethoxy)]ethyl}-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid

MS (ESI), m/z ber, $C_{17}H_{22}N_8O_4$ (402): 403 $[M+H]^+$.

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 10,65 (s, 1H), δ 8,69 (t, 1H), δ 8,6 (d, 2H), δ 8,16 (d, 2H), δ 3,5-3,6 (m, 20H), δ 3,45 (q, 3H), δ 3,35 (t, 5H)

4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl 5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonat

(Dansyltetrazin)

MS (ESI), m/z ber, $C_{20}H_{17}N_5O_3S$ (407): 408 $[M+H]^+$.

1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): 10,194 (s, ArH, 1H), 8,614 (d, $J=8,5$ Hz ArH, 1H), 8,484 (m, ArH), 8,113 (d, $J=8$ Hz, ArH, 1H), 7,691 (t, $J=8,3$ Hz, ArH 1H), 7,456 (t, 8,3 Hz, ArH 1H), 7,266 (d, $J=7,8$ Hz, ArH 1H), 7,165 (d, $J= 8,7$ Hz, ArH 2H), 2,921 (s, CH_3 , 6H)

4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl azidomethanesulfonat

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 10,65 (s, 1H), δ 8,65 (d, 2H), δ 7,65 (d, 2H), δ 5,75 (s, 2H)

4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenol acetat

MS (ESI), m/z ber, $C_{10}H_{10}N_4O_3$ (234): 175 $[M+H]^+ - CH_3COO^-$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 10,4 (s, 1H), δ 8,35 (d, 2H), δ 7,0 (d, 2H), δ 1,81 (s, 3H)

Tert-butyl (2-azidoethyl)carbamat

MS (ESI), m/z ber, $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ (187): 188 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 3,31 (m, 2H), δ 3,22 (m, 2H), δ 1,44 (s, 9H)

N-(prop-2-yn-1-yl)-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)-benzamid

MS (ESI), m/z ber, $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$ (239): 240 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 10,6 (s, 1H), δ 9,2 (t, 1H), δ 8,6 (d, 2H), δ 8,15 (d, 2H), δ 4,11 (m, 2H), δ 3,17 (m, 1H)

N-{2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethyl}bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid

MS (ESI), m/z ber, $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$ (343): 344 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 9,4 (s, 1H), δ 8,5 (d, 1H), δ 8,1 (t, 1H), δ 6,44 (d, 1H), δ 6,1 (m, 2H), δ 3,36 (m, 2H), δ 2,9 (d, 2H), δ 1,9 (m, 2H), δ 1,7 (m, 1H), δ 1,5 (m, 1H), δ 1,1 (m, 2H), δ 0,9 (d, 2H)

4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure

MS (ESI), m/z ber, $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_2$ (202): 203 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ): 10.66 (s, ArH, 1H), 8.62 (d, $J=8$ Hz, ArH, 2H), 8.22 (d, $J=8$ Hz, ArH, 2H)

N-(2-Aminoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxamid

MS (ESI), *m/z* ber, C₁₀H₁₆N₂O (180): 181 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 6,14 (m, 2H), δ 3,5 (m, 2H), δ 3,05 (m, 3H), δ 2,9 (d, 2H), δ 2,15 (m, 1H), δ 1,9 (m, 1H), δ 1,65 (m, 1H), δ 1,3 (m, 2H), δ 0,9 (d, 2H)

Tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amin

MS (ESI), *m/z* ber, C₁₈H₃₀N₁₀O₃ (432): 433 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 8,3 (d, 3H), δ 4,48 (t, 6H), δ 4,37 (s, 6H), δ 3,41 (t, 6H), δ 1,98 (m, 6H)

N-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid

MS (ESI), *m/z* ber, C₁₅H₁₂N₆O₃ (324): 325 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 10,65 (0,5 H), δ 8,8 (t, 1H), δ 8,55 (d, 2H), δ 8,0 (d, 2H), δ 7,02 (s, 2H), δ 3,62 (t, 2H), δ 3,455 (q, 2H)

1-{4-[2-Methoxyethenyl]phenyl}-3-propinylharnstoff (cis, trans Gemisch)

MS (ESI), *m/z* ber, C₁₃H₁₄N₂O₂ (230): 231 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 8,41 (s, 1H), δ 7,25 (m, 2H), δ 7,15 (m, 3H), δ 6,4 (t, 1H), δ 5,74 (d, 1H), δ 3,85 (m, 3H), δ 3,49 (s, 3H)

4-Carbamidamidophenyl pentinoat (Pentinsäure-OGp)

MS (ESI), *m/z* ber, C₁₂H₁₃N₃O₂ (231): 232 [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, referenziert auf internes TMS bei 0 ppm): δ 7,19 (m, 2H), δ 7,39 (m, 2H), δ 2,79 (t, 2H), δ 2,494 (m, 3H)

N-[2-(2,5-Dioxo-2,5-Dihydro-1H-Pyrrol-1-yl)Ethyl]Bicycle[2.2.1]Hept-5-en-2-Carboxamid (Norb-Maleinimid)

MS (ESI) m/z ber, C₁₄H₁₆N₂O₃ (260,2): 261.2 (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, referenziert auf internes TMS bei 0ppm): δ 7,97 (t, J=5,7 Hz, -NH-, 1H), 7,02 (s, -CH=CH- (Maleinimid), 2H), 6,11 (d, J=8,3 Hz, -CH=CH- (Norb), 2H), 3,45 (t, J=5,4 Hz, -CH₂-, 2H), 3,27 (m, -CH-, 1H), 3,14 (m, -CH-, 1H), 2,81 (s, -CH-, 1H), 2,75 (s, -CH-, 1H), 1,9 (m, -CH-, 1H), 1,73 (m, -CH-, 1H), 1,54 (d, J=7,7 Hz, -CH-, 1H), 1,54 (d, J= 7,7 Hz, -CH-, 1H), 1,17-1,05 (m, -CH-, 2H).

Norb-DMI

MS (ESI), m/z C₄₉H₆₄ClN₅O₁₃S (998,5): 999,5 [M+H]⁺

Die Derivate Methoxy-PEG-tetrazinylbenzoat und Norb-PEG wurden keiner weiteren Analytik unterzogen.

Peptid ²⁶ MS (ESI)	m/z _{ber.} [M]	m/z _{gef.} [M+H] ⁺
RHAAC-OH	556	557
Bz-AAYRAAG-OH	782	783
Bz-AAYRHAAG-OH	919	920
Bz-AAYRHAAAG-OH	990	991
Bz-AAYRAHAAG-OH	990	991
Bz-AAYRAAHAG	990	991

²⁶ Die Peptidanalytik beschränkt sich auf die massenspektrometrische Analyse

Peptid MS (ESI)	m/zber. [M]	m/zgef. [M+H ⁺]
RAHAK(5,6CF)-NH ₂	938	939
RAHAK(5,6CFI)-OH	939	940
RAAHK(5,6CFI)-OH	1010	1011
RHAAC(Tetrazin)-OH	882	883
RHAC(Tetrazin)-OH	809	810

10.2. PROTEINSEQUENZEN

Strep-YRHA-hCyp18

GWSHPQFEKY RHAVNPTVFF DIAVDGEPLG RVSFELFADK VPKTAENFRA LSTGEKGFY
 KGSCFHRIIP GFMCQGGDFT RHNGTGGKSI YGEKFEDENF ILKHTGPGIL SMANAGPNTN
 GSQFFICTAK TEWLDGKHV FGKVKEGMNI VEAMERFGSR NGKTSKKITI ADCGQLE

Anzahl Aminosäuren: 177

Molekulargewicht: 19506 Da

Strep-YRAH-hCyP18-AYRHAAG

GWSHPQFEKY RHAVNPTVF FDIAVDGEPL GRVSFELFAD KVPKTAENFR ALSTGEKGFY
 YKGSCFHRII PGFMCQGGDF TRHNGTGGKS IYGEKFEDEN FILKHTGPGI LSMANAGPNT
 NGSQFFICTA KTEWLDGKHV VFGKVKEGMN IVEAMERFGS RNGKTSKKIT IADCGQLAYR
 HAAG

Anzahl Aminosäuren: 184

Molekulargewicht: 20174,8 Da

Strep-YRH-hPin1

GWSHPQFEKY	RHADEEKLPP	GWEKRMSRSS	GRVYYFNHIT	NASQWERPSG	NSSSGGKNGQ
GEPARVRCSH	LLVKHSQSRR	PSSWRQEKIT	RTKEEALELI	NGYIQKIKSG	EEDFESLASQ
FSDCSSAKAR	GDLGAFSRGQ	MQKPFEDASF	ALRTGEMSGP	VFTDSGIHII	LRTE

Anzahl Aminosäuren: 174**Molekulargewicht:** 19665,7**Strep-YRH-Par10**

GWSHPQFEKY	RHAKTAAALH	ILVKEEKLAL	DLLEQIKNGA	DFGKLAKKHS	ICPSGKRGGD
LGEFRQQQMV	PAFDKVVVFC	PVLEPTGPLH	TQFGYHIIKV	LYRN	

Anzahl Aminosäuren: 104**Molekulargewicht:** 11654,5 Da**Fab-Anti-Her2-YRHAAG-StrepII***Schwere Kette:*

EVKLQESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDFYAMDYW	GQGTLTVSS
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP	KSCADKTHYR	HAAGWSPQF
EK					

Leichte Kette:

DIELTQSPSS	LSASVGDRV	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
RFSGSRSGTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKLEIKRTV	AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

Anzahl Aminosäuren: 456**Molekulargewicht:** 49422 Da

F_{ab}-Anti-Her2-YRHAAG-Myc*Schwere Kette:*

EVKLQESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGLTIVTSS
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP	KSCADKTH ^{YR}	^H AAGEQKLIS
EEDL					

Leichte Kette:

DIELTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
RFGSRSRGTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKLEIKRTV	AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

Anzahl Aminosäuren: 457**Molekulargewicht: 49575 Da****F_{ab}-Anti-TNF α - YRHAA-StrepII***Leichte Kette*

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKASQNVG	TNVAWYQQKP	GKAPKALIYS	ASFLYSGVPY
RFGSGSGTGD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	YNIYPLTFGQ	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

Schwere Kette

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYVFT	DYGMNWVRQA	PGKGLEWMGW	INTYIGEPIY
ADSVKGRFTF	SLDTSKSTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGY	RSYAMDYWGQ	GTLVTVSSAS
TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL
YSLSSVVTVP	SSSLGTQTYI	CNVNHKPSNT	KVDKKVEPKS	CDKHTYRHA	AGWSHPQFEK

454 Aminosäuren**49211 Da****Tn K60E/D189K/Y39H/Y59H**

IVGGYTCQEN	SVPYQVSLNS	GHHFCGGLI	NDQWVVSAAH	CHESRIQVRL	GEHNINVLEG
NEQFVNAAKI	IKHPNFDKRT	LNNDIMLIK	SSPVKLNAR	ATVALPSSCA	PAGTQCLISG
WGNTLSSGVN	EPDLLQCLDA	PLLPQADCEA	SYPGKITDNM	VCVGFLEGGK	DSCQGDSSGP
VVCNGELQGI	VSWGYGALP	DNPGVYTKVC	NYVDWIQDTI	AAN	

Anzahl Aminosäuren: 223**Molekulargewicht: 23731 Da**

Publikationsverzeichnis

C. Meyer, S. Liebscher, F. Bordusa: **Selective Coupling of Click Anchors to Proteins via Trypsiligase**. *Bioconjugate Chemistry* 2016, 27, 47.

Danksagung

Ich möchte *Prof. Dr. Frank Bordusa* für die Überlassung des interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Förderung meiner Arbeit danken.

Bei Frau *Dr. Sandra Liebscher* möchte ich mich für Ihre tatkräftige Unterstützung in proteinchemischen Dingen, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Bei Frau *Dr. Nicole Wehofsky* möchte ich mich für ihre Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen der schriftlichen Entwürfe dieser Arbeit bedanken.

Bei *Frau Steffi Kaufmann* möchte ich mich für ihre fortwährende, tatkräftige technische Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt ganz besonders der über lange Jahre anhaltenden Unterstützung meiner Familie und meiner Freundin Stefanie.

Bei allen hier nicht genannten des Arbeitskreises um Prof. Frank Bordusa möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel sowie andere als die von mir angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien und Dienstleistungen sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Dissertation eingereicht.

Halle(Saale),den _____

(Christoph Meyer)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Christoph Meyer
Geburtsdatum	6. Oktober 1979
Geburtsort	Trier
Geschlecht	männlich
Anschrift	Pulsnitzer Str. 5, 01454 Radeberg
Akademischer Grad	Diplom-Biochemiker
Staatsangehörigkeit	deutsch
Fachgebiet der Promotion	Biochemie

Studium

Oktober 1999-März 2000	Studium der Chemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
März 2000-Oktober 2003	Studium der Biochemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Oktober 2003-September 2004	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Oktober 2004-Mai 2006	Studium der Biochemie mit Abschluss als Diplom-Biochemiker an der Eberhard Karls Universität Tübingen. Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Frank Bordusa mit dem Titel: „Änderung der Spezifität von Trypsin zur ortsspezifischen Modifizierung von Proteinen“.
Juli 2006-Dezember 2010	Dissertation unter Betreuung von Prof. Frank Bordusa mit dem Titel: „Kombination chemischer und enzymatischer Methoden zur regiospezifischen Modifizierung von Proteinen“

Radeberg

(Christoph Meyer)