

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Max-Planck-Institut für Biochemie

Beiträge zur *in vivo* Proteinbiosynthese unter Verwendung nicht-kanonischer Aminosäuren

Lars Merkel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Groll
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Nediljko Budisa
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
3. Univ.-Prof. Dr. Thomas Kiefhaber

Die Dissertation wurde am 14.08.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20.10.2008 angenommen.

Meinen Eltern

Herbst

Noch ist Raum
Zwischen den Blättern
Und das letzte Wort
Fest unter der Zunge

Bärbel Höttges

Rosen

Dass jede Rosen Dornen hat,
Scheint mir kein Grund zu klagen,
Solange uns die Dornen nur
Auch weiter Rosen tragen.

Mascha Kaléko

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

L. Merkel, C. Acevedo-Rocha, A.-S. Geiermann, N. Budisa, in Vorbereitung.

L. Merkel, A.-S. Geiermann, N. Budisa, *J. Peptide Sci.*, in Vorbereitung.

L. Merkel, H. S. G. Beckmann, V. Wittmann, N. Budisa, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1220–1224.

L. Merkel, Y. Cheburkin, B. Wiltschi, N. Budisa, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2227–2232.

Patentanmeldungen:

N. Budisa, **L. Merkel**, Y. Cheburkin, P. Knyazev, A. Ullrich, B. Wiltschi, 39954P EP/WWdv, Max Planck Innovations, AZ: 0240-3726 ZLI, **2007**.

Posterbeiträge:

L. Merkel, A.-S. Geiermann, N. Budisa, BMBF-Wettbewerb BioFuture – 6. Präsentation, 29. – 30. Januar **2008**, Berlin.

L. Merkel, B. Mulinacci, A. M. Papini, N. Budisa, PeptLap Symposium, 12. Mai **2007**, Florenz, Italien.

L. Merkel, N. Budisa, 1st European Chemistry Congress, Abstract: J-PO-22, 27. – 31. August **2006**, Budapest, Ungarn.

B. Wiltschi, W. Wenger, **L. Merkel**, Y. Cheburkin, C. Wolschner, S. Lepthien, N. Budisa, BMBF-Wettbewerb BioFuture – 5. Präsentation, 02. – 03. Februar **2006**, Berlin.

Vorträge:

6th Graduate Retreat, 26. – 28. Juni **2006**, Schloss Ringberg.

Weitere wissenschaftliche Veröffentlichungen:

S. Dong, **L. Merkel**, N. Budisa, L. Moroder, *J. Pept. Sci.*, im Druck.

S. Lepthien, M. Hösl, **L. Merkel**, N. Budisa, *PNAS*, eingereicht.

L. Merkel, L. Moroder, N. Budisa, *Synthetic and semisynthetic proteins: Total chemical synthesis, modifications, semisyntheses and chemoenzymatic ligations.*, in: *Protein Engineering*, Eds: T. RajBhandary und C. Koehler, Springer Verlag Berlin – Heidelberg – New York, im Druck.

L. Merkel, N. Budisa, *BIOspektrum* **2006**, *12*, 41–43.

A. Schmidt, T. Habeck, **L. Merkel**, M. Mäkinen, P. Vainiotalo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2211–2216.

A. Schmidt, **L. Merkel**, W. Einfeld, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *10*, 2124–2130.

Abkürzungsverzeichnis

Außer den im Deutschen gängigen Abkürzungen sowie den SI-Einheiten und deren Ableitungen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

abs.	absolut wasserfrei
Ac	Acetyl
Aha	Azidohomoalanin
Amp	Ampicillin
amu	Atomare Masseneinheit (eng. atomic mass unit)
anxA5	Annexin 5
APS	Ammoniumpersulfat
Äq.	Äquivalent(e)
ATP	Adenosintriphosphat
b*	Barstar
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BuOH	<i>n</i> -Butanol
CCHC	Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition (eng.: copper catalyzed Huisgen cycloaddition)
CD	Circulardichroismus
CFI	5-Carboxyfluorescein
cHex	Cyclohexan
ChiAc ₂	<i>N,N'</i> -Diacetylchitobiose
Cpa	β -Cyclopropylalanin
d	Dublett
Da	Dalton
DAB	2,4-Diaminobuttersäure
de	Diastereomenüberschuss (eng.: diastereomeric excess)
dd	Doppeltes Dublett
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
ECFP	Sequenzoptimiertes cyan fluoreszierendes Protein (eng: enhanced cyan fluorexcent protein)
<i>E. coli</i> (<i>Ec</i>)	<i>Escherichia coli</i>
EDCI	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid-hydrochlorid
ee	Enantiomenüberschuss (eng.: enantiomeric excess)
EE	Essigsäureethylester
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (eng.: ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (eng.: epidermal growth factor)

EGFP	Sequenzoptimiertes grün fluoreszierendes Protein (eng.: enhanced green fluorescent protein)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (eng.: enzyme linked immunosorbent assay)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
ges.	gesättigt
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-uronium-hexafluorophosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
Hex	<i>n</i> -Hexan
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hpg	Homopropargylglycin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kan	Kanamycin
LC	Flüssigchromatographie (eng.: liquid chromatography)
LB	Luria-Bertani
m	Multipllett
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (eng.: matrix assisted laser desorption/ionization)
MeOH	Methanol
MetAP	Methioninaminopeptidase
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein
MS	Multiple Sklerose
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Nle	Norleucin
NME	N-terminale Methioninabspaltung (eng.: N-terminal methionine excision)
NMM	New minimal medium
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (eng.: nuclear magnetic resonance)
NRE	N-terminale Aminosäurenabspaltung (eng.: N-terminal residue excision)

OASS	<i>O</i> -Acetylserinsulfhydrylase
OD	Optische Dichte
OSu	(<i>N</i> -Hydroxy-succinimid)-ester
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (eng.: phosphate buffered saline)
P_i	Phosphat-Anion (PO_4^{3-})
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP_i	Pyrophosphat-Anion ($P_2O_7^{4-}$)
ppm	Teile von einer Million (eng.: parts per million)
Py	Pyridin
<i>P. furiosus</i> (<i>Pf</i>)	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RP-HPLC	Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (eng.: reversed phase high performance liquid chromatography)
rpm	Umdrehungen pro Minute (eng.: revolutions per minute)
Rt	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat (eng.: sodium dodecylsulfate)
SPI	Selektionsdruck-Einbau (eng.: selective pressure incorporation)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (eng.: surface plasmon resonance)
t	Triplet
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TFA	Trifluoressigsäure (eng.: trifluoroacetic acid)
THF	Tetrahydrofuran
	Tetrahydrofolat
T_m	Schmelzpunkt
TNB	5-Mercapto-2-nitrobenzoat (eng.: thio-2-nitrobenzoic acid)
t_R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
Ts	Tosyl
U	Einheit (eng.: unit)
üN	über Nacht
UZ	Ultrazentrifuge
WGA	Weizenkeimagglutinin (eng.: Wheat Germ Agglutinin)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der genetische Code und die Proteinbiosynthese	1
1.2	Methionin - eine besondere Aminosäure	4
1.2.1	Charakteristika und Metabolismus	4
1.2.2	Methionin als Startsignal der Proteinbiosynthese	7
1.2.3	N-terminale Methioninabspaltung	8
1.3	Co- und posttranslationale Modifizierungen	9
1.3.1	Glycosylierungen	9
1.4	Die Erweiterung des genetischen Codes <i>in vivo</i>	11
1.5	Alkin- und azidfunktionalisierte Aminosäuren	13
1.6	Zielsetzung	17
2	Ergebnisse und Diskussion	18
2.1	Peptidische Vorarbeiten zur Etablierung der Kupfer-katalysierten Huisgen-Cycloaddition auf Proteinebene	18
2.1.1	Synthese eines Peptids mit einem Strukturelement des MOG-Proteins	18
2.1.2	Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition des Peptids mit azidfunktionalisierten Kohlenhydraten	20
2.1.3	ELISA-Tests mit dem konjugierten Glycopeptid	22
2.2	Synthese von Methioninanaloga	22
2.2.1	Chemische Synthese von L-Azidoalanin	23
2.2.2	Enzymatische Synthese von L-Azidoalanin	24
2.2.2.1	Isolierung und Expression von <i>O</i> -Acetylserinsulfhydrylase-A	24
2.2.2.2	Aktivitätsassay für rOASS-A	28
2.2.2.3	rOASS-A-katalysierte Darstellung von L-Azidoalanin	29
2.2.3	Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses der dargestellten L-Azidoalanine	30
2.2.4	Enzymatische Synthese von L-Azidohomoalanin	32
2.2.5	Chemische Synthese von L-Azidohomoalanin	32
2.3	Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition mit Aha ¹ - und Hpg ¹ -Barstar	33
2.3.1	Expression und Reinigung der Barstarvarianten	34
2.3.2	Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition der Barstarvarianten mit Fluoreszenzfarbstoffen	35
2.3.2.1	Synthese geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe	35
2.3.2.2	Konjugation der Barstarvarianten mit den Fluoreszenzfarbstoffen	37

2.3.3	Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition von Aha- ψ -b* mit alkin-funktionalisierten Kohlenhydraten	40
2.3.3.1	Barnaseinhibition durch Aha- ψ -b* und seine Glycokonjugate	42
2.3.3.2	SPR-Experimente mit Aha- ψ -b* und seinen Glycokonjugaten	43
2.3.3.3	Biophysikalische Charakterisierung der Glycokonjugate von Aha- ψ -b*	44
2.4	Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition von hEGF mit einem azidfunktionalisiertem Kohlenhydrat	47
2.5	N-terminale Aminosäureabspaltung	51
2.5.1	N-terminale Aminosäureabspaltung bei hEGF	51
2.5.1.1	N-terminale Aminosäureabspaltung <i>in vitro</i>	51
2.5.1.2	N-terminale Aminosäureabspaltung <i>in vivo</i>	54
2.5.2	N-Terminale Aminosäureabspaltung bei GFP und anxA5	56
2.5.2.1	N-Terminale Aminosäureabspaltung <i>in vitro</i>	56
2.5.2.2	Charakterisierung und Expression der GFP- und Annexinmutanten	61
2.5.2.3	N-terminale Aminosäureabspaltung <i>in vivo</i> von Annexin und GFP	64
3	Zusammenfassung und Ausblick	66
4	Experimenteller Teil	68
4.1	Allgemeines, analytische Methoden und Geräte	68
4.2	Allgemeine chemische Arbeitsvorschriften	74
4.3	Synthesen	77
4.4	Peptidsynthesen	85
4.5	Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition von Peptiden	88
4.6	ELISA-Tests	89
4.7	N-terminale Methioninabspaltung – <i>in vitro</i> -Assays	89
4.8	Puffer, Medien und allgemeine biologische Arbeitsvorschriften	90
5	Literatur	108
	Anhang	116

1 Einleitung

1.1 Der genetische Code und die Proteinbiosynthese

In biologischen Systemen ist „der Transfer von Information nur von Nucleinsäure zu Nucleinsäure sowie von Nucleinsäure zu Protein möglich; ein Transfer von Protein zu Protein oder Protein zu Nucleinsäure dagegen ist unmöglich.“^[1] Das heißt, Nucleinsäuren codieren Informationen, die in Form von Proteinen Gestalt annehmen. Diese erstmals von CRICK aufgestellte Behauptung wird als das zentrale Dogma der Molekularbiologie bezeichnet. Die präzise Informationsweitergabe ist dabei nur möglich, wenn die im sogenannten genetischen Code (siehe Abb. 1) festgelegte Korrelation einer bestimmten Nucleotidsequenz aus den vier Basen (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Uracil (U)) mit einer Aminosäuresequenz streng befolgt wird.

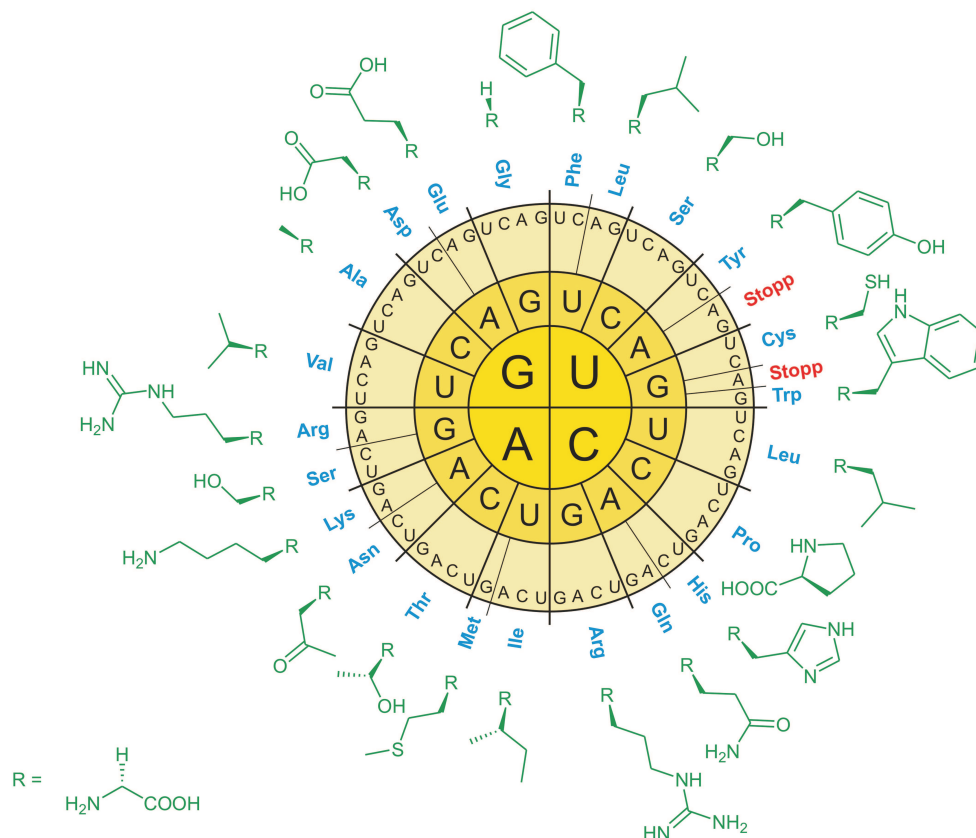


Abb. 1: Darstellung des genetischen Codes im RNA-Format. Die zwanzig kanonischen Aminosäuren werden sowohl im Dreibuchstabencode (blau) als auch in Form ihrer Seitenkette (grün) dargestellt. Von den 64 Dreierkombinationen (Codons) der vier Nucleotide (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Uracil (U)) sind 61 Codons den 20 Aminosäuren zugeordnet, die drei verbleibenden fungieren als Stopp-Codons (rot).

Eine Besonderheit ist die Degeneration oder Redundanz des genetischen Codes. Mit den Ausnahmen von Methionin und Tryptophan (AUG bzw. UGG) codieren mehrere Codons

für dieselbe Aminosäure. Auffällig ist, dass sich diese Codons in der Regel nur durch eine Base unterscheiden. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass durch (spontane) Mutation einer Base das Codon dennoch für die richtige Aminosäure codiert (Wobble-Hypothese). Außerdem besteht eine gewisse Korrelation zwischen der mittleren Base eines Codons und der chemischen Natur der entsprechenden Aminosäure. Dabei werden eher hydrophobe Aminosäuren durch Codons mit Uracil in der mittleren Position codiert, polare bis neutrale Aminosäuren hingegen von Codons mit Cytosin als zweite Base. Geladene Aminosäuren entsprechen Codons mit Adenin an zweiter Stelle und Guanin codiert für geladene, neutrale bis polare Aminosäuren.^{[2],[3]} Somit bleibt bei einer (spontanen) Mutation der ersten und dritten Base zumindest der Charakter der codierten Aminosäure gleich.^[4] Negative Auswirkungen der Mutation auf die Faltung und Funktionsfähigkeit des Proteins werden dadurch minimiert.

Der genetische Code gilt im Großen und Ganzen für alle bekannten Lebensformen. Nur in wenigen Ausnahmen, z. B. in den Mitochondrien verschiedener Spezies, gibt es Abweichungen von der Interpretation wie sie in Abb. 1 dargestellt ist.^[5] Des Weiteren existieren neben den zwanzig kanonischen Aminosäuren mindestens zwei weitere Aminosäuren, die während der ribosomalen Proteinbiosynthese verwendet werden. Allerdings sind für den cotranslationalen Einbau von Selenocystein^[6] und Pyrrolysin^[7] jeweils weitere Translationsfaktoren sowie spezifische Erkennungsstrukturen in der RNA etc. notwendig.^[5]

Die genetische Information ist in der DNA gespeichert, die in allen Organismen durch Replikation an die Tochterzellen weitergegeben wird. Die zur Proteinbiosynthese benötigte Vorlage aus Nucleotiden wird wie folgt generiert: An spezifischen Promoterstellen der DNA-Doppelhelix – sogenannten TATA- oder Pribnow-Boxen – lagert sich die RNA-Polymerase an, woraufhin sich der DNA-Doppelstrang partiell entwindet und die RNA-Synthese initiiert wird. Bei der sich anschließenden Elongation des RNA-Stranges bildet sich ein stabiler Dreierkomplex aus RNA-Polymerase, DNA und RNA, der allerdings gleichzeitig den DNA-Matrizenstrang in Richtung 3'-Ende entlanggleitet und so eine fortwährend schnelle Synthese ermöglicht (50 – 100 Polymerisationsschritte pro Sekunde). An spezifischen – Terminator genannten – DNA-Sequenzstellen zerfällt der Komplex und die RNA-Synthese ist beendet. Auf diesem Wege wird ein zur Matrizen-DNA komplementäres RNA-Molekül synthetisiert (Transkription genannt), das – in eukaryotischen Zellen nach weiteren Modifikationen – seinerseits als Vorlage für die Proteinbiosynthese dient und Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) genannt wird.^[5] Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass RNA Uracil (U) anstelle von Thymin (T) enthält.

Für eine erfolgreiche Proteinbiosynthese muss allerdings eine weitere Voraussetzung geschaffen werden: Die kanonischen Aminosäuren müssen an die Positionen gebracht werden, die eine mRNA-Sequenz ihnen laut dem genetischen Code zuweist. Diese Aufgabe übernimmt eine weitere RNA-Spezies, die Transfer-RNA (tRNA), von der jede Zelle mindestens

60 verschiedene Arten aufweist.^[5] Die zwei in diesem Zusammenhang wichtigsten Strukturmerkmale der tRNAs sind das Anticodon und der Akzeptorarm. Das Anticodon liegt im Zentrum einer 7-Nucleotid-Schleife und seine drei Basen sind komplementär zum entsprechenden Codon auf der mRNA (z. B. Codon auf der mRNA: 5'-AUG-3' → Anticodon auf der tRNA: 5'-CAU-3', Hybrid: $\begin{smallmatrix} AUG \\ UAC \end{smallmatrix}$). Diese Codon-Anticodon-Wechselwirkung ist einer von zwei Faktoren, um eine richtige Interpretation des genetischen Codes sicherzustellen. Der zweite Faktor ist die korrekte Beladung des Akzeptorarms am 3'-OH-Ende einer tRNA mit ihrer korrespondierenden Aminosäure. Diese wird mit Hilfe von entsprechenden Enzymen, den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS), vollzogen. In *E. coli* existiert für jede kanonische Aminosäure eine aaRS, die die entsprechenden tRNAs belädt, wobei die aaRS nicht nur zwischen den kanonischen Aminosäuren, sondern auch den ebenfalls in der Zelle vorliegenden natürlichen Aminosäuren (z. B. Homocystein) unterscheiden müssen. In anderen Organismen können allerdings auch weniger als 20 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen auftreten.^[8] In diesen Fällen werden die fehlenden Aminosäuren durch chemische Modifizierung der korrekt beladenen tRNA gebildet. Nach der erfolgreichen Aminosäurererkennung und der Beladung der tRNA (Aminoacylierung) wird die Aminoacyl-tRNA zum Ribosom transportiert, wo die Translation stattfindet.

Die prokaryotische Proteinbiosynthese beginnt mit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nucleotiden der kleineren Unterheit des Ribosoms (rRNA) mit dem sogenannten 5'-Nicht-Codierungsbereich der mRNA. Durch diese Wechselwirkung wird das Startcodon (AUG) nahe dem P-Ort (Peptidyl- oder Bindungsort) des Ribosoms lokalisiert. Die Feinabstimmung der Positionierung gelingt durch das Einführen der Initiations-tRNA und der Codon-Anticodon-Bindung. Der P-Ort ist das mittlere von drei katalytischen Zentren am Ribosom, die für die Proteinbiosynthese wichtig sind. Die beiden weiteren Orte werden als A-Ort (Aminoacyl- oder Erkennungsort) bzw. als E-Ort (Ausgangs- oder Exitort) bezeichnet.

Nach der Anlagerung der Initiations-tRNA im P-Ort befindet sich das nächste codierende Triplet der mRNA im A-Ort. Dorthin gelangt im Folgeschritt die Aminoacyl-tRNA, deren Codon zum Anticodon im A-Ort komplementär ist. An diesem Prozess sind allerdings weitere Enzyme, die Elongationsfaktoren, beteiligt. Als Nächstes löst sich Formylmethionin aus der Initiator-tRNA im P-Ort (dies gilt nur für Bakterien, in höheren Organismen ist die Initiator-tRNA mit Methionin beladen) und geht mit seiner Carboxy-Gruppe eine Amidbindung mit der Aminogruppe der Aminosäure im A-Ort ein; es befindet sich nun also eine Dipeptidyl-tRNA im A-Ort. Den Schluss des ersten Elongationsschrittes bildet die Bewegung des Ribosoms relativ zur mRNA (Translokation), die ihrerseits ebenfalls spezielle Elongationsfaktoren benötigt. Durch die Translokation wird die wachsende Polypeptidkette im P-Ort lokalisiert und die unbeladene tRNA im E-Ort. Der A-Ort wiederum befindet sich über dem folgenden Triplet und kann die nächste Aminoacyl-tRNA bin-

den. Der Zyklus der hier genannten Schritte resultiert in der Proteinbiosynthese, bei der die einzelnen Aminosäuren durch Amidbindungen verknüpft werden. Die Proteinbiosynthese läuft mit ca. 10 – 20 Polymerisationsreaktionen pro Sekunde etwa fünfmal langsamer ab als die RNA-Synthese.

Abgebrochen wird die Proteinbiosynthese eines einzelnen Proteins durch die Anwesenheit eines Stopcodons (UAG, UAA oder UGA, siehe Abb. 1) auf der entsprechenden mRNA, da im Allgemeinen keine tRNAs mit zu Stopcodons komplementären Anticodons existieren. Durch diese Unterbrechung in der Synthese bietet sich für die sogenannten Terminationsfaktoren die Möglichkeit, an das Ribosom zu binden und die Polypeptidkette von der Peptidyl-tRNA zu lösen und somit das Protein freizusetzen. Die an der Replikation der DNA vor der Zellteilung, Transkription, Aminoacylierung und Translation beteiligten Gene sind in allen Lebensformen nahezu universell konserviert.^[9]

1.2 Methionin - eine besondere Aminosäure

1.2.1 Charakteristika und Metabolismus

In den Zellen aller Lebewesen kommen im Großen und Ganzen nur vier schwefelhaltige Aminosäuren vor: Methionin (**1**), Homocystein (**2**), Cystein (**3**) und Taurin (**4**), wobei **4** genau genommen der Klasse der Aminosulfonsäuren zuzuordnen ist (siehe Abb. 2).

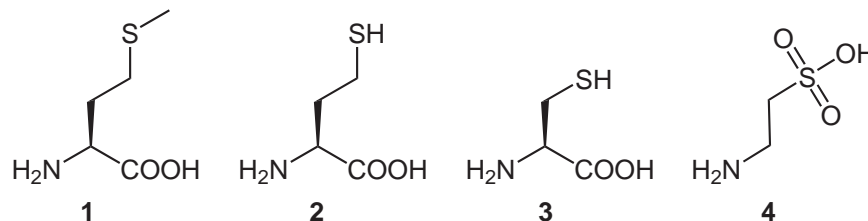


Abb. 2: Strukturformeln der vier häufigsten in natürlichen Organismen vorkommenden schwefelhaltigen Aminosäuren: Methionin (**1**), Homocystein (**2**), Cystein (**3**) und Taurin (**4**).

Von diesen vier Aminosäuren werden allerdings nur Methionin (**1**) und Cystein (**3**) zur Proteinbiosynthese verwendet (siehe 1.1), während **2** ein wichtiges Intermediat im Methioninmetabolismus darstellt und **4** u. a. als Endprodukt im Cysteinkatabolismus auftritt.^[10]

Da außer **1** und **3** die zur Proteinbiosynthese benötigten Aminosäuren ausschließlich aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff bestehen sowie Sauerstoff und Schwefel in derselben Gruppe im PSE stehen, stellt sich die Frage, ob Aminosäuren, bei denen das Schwefel-Atom gegen ein Sauerstoff-Atom ausgetauscht worden ist, in Proteinen die Funktion von Methionin bzw. Cystein übernehmen können. Dass diese Frage mit Nein zu beantworten ist, liegt vor allem in der unterschiedlichen Elektronegativität. So steht Sauerstoff mit einem Wert von 3,5 an zweiter Stelle der elektronegativsten Elemente, während

Schwefel nur einen Wert von 2,5 aufweist. Der Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel würde also im Methionin zu einer größeren Hydrophilie führen. Des Weiteren können Cysteine Disulfidbrücken ausbilden, die eine wichtige Funktion bezüglich der Proteinfaltung und -stabilität innehaben. Die Bildung von Dioxidbrücken im Falle von Serin – dem sauerstoffhaltigen Analogon, das ebenfalls in Proteinen vorkommt, – ist hingegen im physiologischen pH-Bereich nicht möglich, da die OH-Gruppe eine wesentlich schwächere Säure ist als die Thiolgruppe.^[11]

Methionin gehört zu den hydrophoben Aminosäuren mit einem Wasser-Oktanol-Verteilungskoeffizient, der ungefähr dem von Leucin und Isoleucin entspricht.^[12] Auf Grund dieser Tatsache befindet sich die Mehrzahl der Methioninreste globulärer Proteine im inneren hydrophoben Kern der Struktur.^[11] Darüber hinaus sind aber auch Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäureresten und der Thioethergruppe in Proteinstrukturen beschrieben worden.^[13] In membrangebundenen Proteindomänen interagieren Methionine oft mit der Lipiddoppelschicht. Vereinzelt sind Methioninreste auch oberflächenexponiert. Letztere sind allerdings anfällig für die Oxidation von **1** zu Methioninsulfoxid (**5**, siehe Abb. 3). Sulfoxide sind optisch aktiv im Falle einer unsymmetrischen Substitution. Bezüglich der Methioninoxidation sollte daher erwähnt werden, dass beide möglichen Epimere entstehen und jeweils ein Enzym existiert (Methioninsulfoxidreduktase Msr), das das entsprechende Sulfoxid (**5**) zu Methionin (**1**) reduziert (MsrA reduziert spezifisch das *S*-Isomer und MsrB das *R*-Isomer).^[14] Interessanterweise werden in einigen Krebszelllinien keine MsrA codierenden mRNAs exprimiert.^[15]

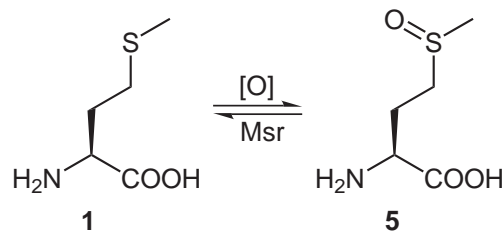


Abb. 3: Oxidation von Methionin (**1**) zu Methioninsulfoxid (**5**), wobei beide mögliche Isomere von **5** entstehen. Beide Epimere können durch eine jeweils für sie spezifische Methioninsulfoxidreduktase (Msr) zu Methionin reduziert werden.

Im Allgemeinen geht die Bildung von Methioninsulfoxid mit einer Veränderung der Hydrophobie der entsprechenden Proteinumgebung einher (BLACK und MOULD^[16] schätzen, dass **5** in seiner Hydrophilie ungefähr dem Lysin entspricht). Dadurch kann es zum Verlust der biologischen Aktivität des Proteins kommen.^{[17],[18]} Allerdings sind auch Beispiele bekannt, in denen die Oxidation keine negative Auswirkung auf die Funktion des entsprechenden Proteins hat.^[19] Die oberflächenexponierten Methioninreste könnten somit die Funktion eines endogenen Antioxidants haben.^{[14],[19]} Die Reversibilität der Methio-

ninoxidation lässt vermuten, dass Methioninreste dadurch an Signaltransduktionen bzw. Regulationsprozessen teilnehmen.^{[14],[18]} So sind zwar alle Aminosäuren – zumindest im Reagenzglas – oxidierbar, doch nur die oxidierten schwefelhaltigen Aminosäuren lassen sich unter physiologischen Bedingungen reduzieren, und für Cystein ist die Teilnahme an Signaltransduktionen bekannt.^[18] Des Weiteren ist es sehr wahrscheinlich, dass ein erhöhter Methioninsulfoxidspiegel im Körper mit altersbedingten sowie neurodegenerativen Krankheiten zusammenhängt.^{[18],[20]}

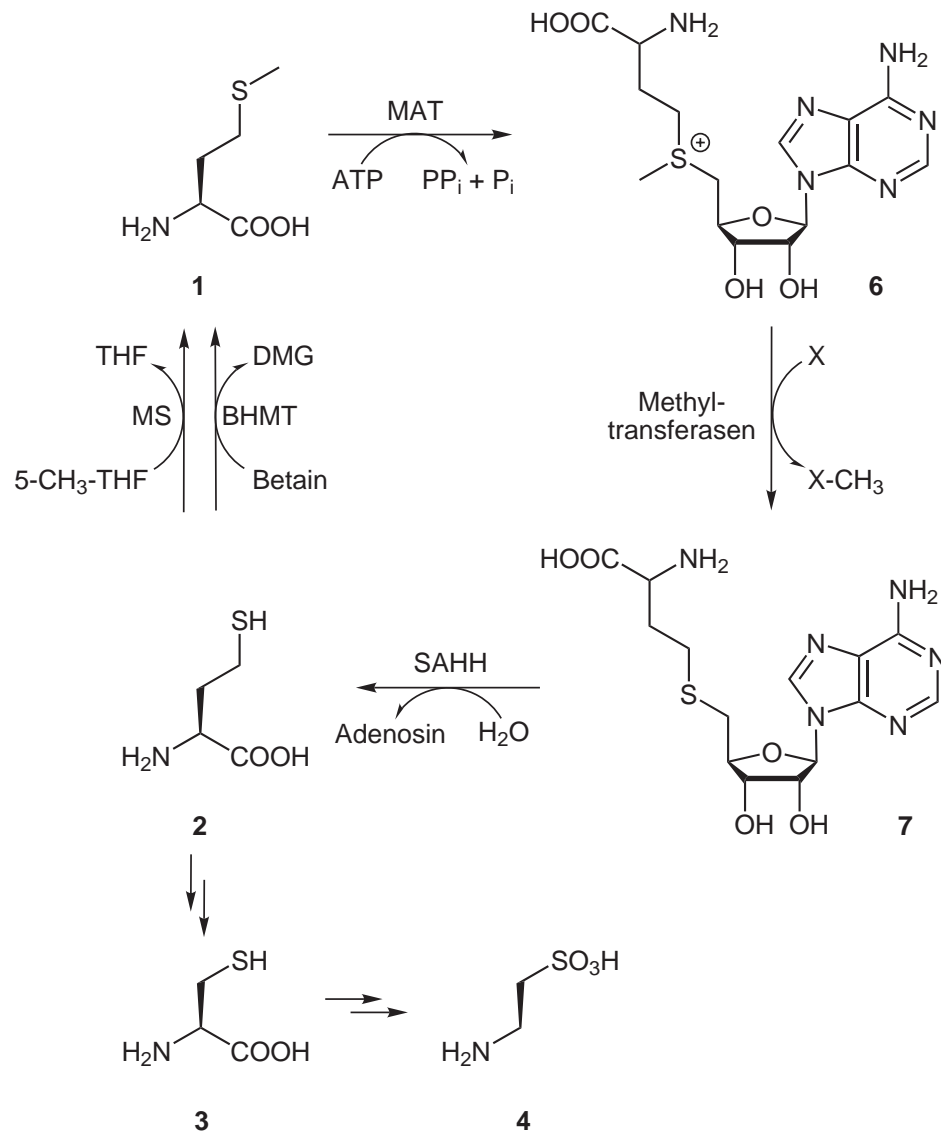


Abb. 4: Methioninmetabolismus nach MICHAL mit MAT: Methioninadenosyltransferase, SAHH: *S*-Adenosylhomocysteinhydrolase, BHMT: Betain:Homocysteinmethyltransferase, MS: Methioninsynthase, THF: Tetrahydrofolat und DMG: *N,N*-Dimethylglycin.^[10]

Methionin ist für Mensch und Tier eine essentielle Aminosäure, d. h., der Körper kann sie nicht selbst synthetisieren und muss sie daher mit der Nahrung aufnehmen. In Prokaryoten hingegen ist die Methioninsynthese die energetisch teuerste von allen Aminosäurensynthesen.^[21] Der Vitamin-B-abhängige^[22] Methioninmetabolismus beginnt mit der Aktivierung von **1** zu *S*-Adenosylmethionin (SAM, **6**) durch ATP und Methioninadenosyltransferase (MAT), wobei alle Phosphatgruppen vom ATP abgespalten werden – dies spricht für ein energiereiches Sulfonium-Ion.^[11] Durch die anschließende Übertragung der Methylgruppe auf einen Donor entsteht das *S*-Adenosylhomocystein (SAH, **7**), welches hydrolytisch zu Homocystein (**2**) und Adenosin gespalten wird. Das entstehende **2** kann entweder erneut zu Methionin (**1**) methyliert oder in einer irreversiblen Reaktion zu Cystein (**3**) umgewandelt werden (siehe Abb. 4). Alternativ wird ein weiterer SAM-unabhängiger Katabolismus diskutiert, der bei normalen Methioninkonzentrationen allerdings nur eine untergeordnete Rolle spielt.^{[10],[23]} Bei stark erhöhter Methioninkonzentration erhält er eine größere Bedeutung – Nachteile dabei sind die entstehenden giftigen Verbindungen wie Methanthiol.^[11]

Ob Homocystein (**2**) remethyliert oder zu Cystein (**3**) umgewandelt wird, hängt vom Bedarf an Methylgruppen in der Zelle ab.^[24] Eine Rolle spielt dabei aber auch die Tatsache, dass die Cysteinkonzentration oft ein limitierender Faktor in der Glutathionsynthese ist. In einigen Zellen wird ungefähr die Hälfte des für diese Synthese benötigten Cysteins über den in Abb. 4 gezeigten Stoffwechselwege trotz physiologischer Konzentrationen von Cystein hergestellt.^{[25],[26]}

Das im Methioninmetabolismus auftretende SAM (**6**) gehört zu den wichtigsten Verbindungen in der Biochemie lebender Zellen. Dieses „aktive Methionin“ wurde erstmals von CANTONI beschrieben^[27] und seine Vielseitigkeit als Coenzym ist enorm.^{[11],[28]} So fungiert es nicht nur als Methyl donor, sondern auch als Quelle für Methylengruppen (z. B. in der Synthese der Cyclopropylfettsäuren), Aminogruppen (u. a. in der Biotinbiosynthese), Aminoisopropylgruppen und 5'-Deoxyadenosylradikale sowie für Schwefel-Atome.^[11] Die Bedeutung von SAM als Methyl donor liegt in seiner Natur als Sulfoniumion und dem daraus resultierenden elektrophilen Charakter des benachbarten Kohlenstoff-Atoms. Dieser ist durch die positive Ladung des Schwefels relativ elektronenarm, was einen nucleophilen Angriff auf ihn erleichtert.^[11]

1.2.2 Methionin als Startsignal der Proteinbiosynthese

Die wichtigste Funktion von Methionin besteht in seiner Eigenschaft als Startsignal für die Proteinbiosynthese in allen Organismen (siehe 1.1). Zwischen 80 und 90 % aller Translationsabschnitte auf bakteriellen und fast alle auf eukaryotischen mRNAs beginnen mit dem entsprechenden AUG-Codon. Durch die in 1.1 beschriebene Wobble-Eigenschaft kön-

nen aber auch die Codons GUG und UUG in Bakterien die Proteinbiosynthese initiieren.^[5] Darüber hinaus ist experimentell nachgewiesen worden, dass auch weitere Codons als Startcodons genutzt werden können.^[29] Unter Laborbedingungen kann die Proteinsynthese *in vivo* durch Variation der Anticodonsequenz außerdem auch mit anderen Aminosäuren als Methionin beginnen.^{[30],[31]}

In der Natur jedoch ist Methionin die als erste translatierte Aminosäure.^[32] Interessanterweise existieren daher zwei tRNAs für Methionin: Die Initiator-tRNA und die Elongator-tRNA. In Bakterien wird das Methionin nach der Beladung auf die Initiator-tRNA außerdem noch formyliert. In höheren Zellen kommt es hingegen nicht zu einer weiteren Modifizierung des Methionins. Durch einige Unterschiede in der tRNA-Struktur kann während der Proteinbiosynthese zwischen den beiden tRNAs differenziert werden, so dass für Methioninreste innerhalb der Aminosäuresequenz ausschließlich die Elongator-tRNA verwendet wird.^[5] DRABKIN und RAJBHANDARY sehen in der in 1.2.1 angesprochene Hydrophobizität des Methionins den Schlüssel für seine Funktion als Startsignal.^[30]

1.2.3 N-terminale Methioninabspaltung

Trotz der Allgemeingültigkeit von Methionin an N-terminaler Position 1 während der ribosomalen Proteinbiosynthese weist in allen Organismen ein großer Anteil der intrazellulären Proteine einen N-Terminus auf, der nicht mit Methionin beginnt – in *E. coli* sind es z. B. zwischen 50 und 60 % der Proteine.^{[33],[34]} Ein Grund hierfür könnte sein, dass Methionin – zumindest für Bakterien – die energetisch „teuerste“ Aminosäure ist.^[21]

Verantwortlich für die N-terminale Methioninabspaltung (N-terminal methionine excision, NME) ist die Methioninaminopeptidase (MetAP).^[35] Dieses metallabhängige Enzym kommt – in unterschiedlichen Isoformen – in allen Lebensformen vor und ist für niedrigere Organismen überlebensnotwendig.^[36] Schon während der Proteinbiosynthese wird von geeigneten N-Termini das Methionin cotranslational und irreversibel abgespalten – allerdings erst nach der Deformylierung.^{[35],[37],[38]} Bei der Abspaltung spielt die Natur der zweiten Aminosäure in der Sequenz eine erhebliche Rolle.^{[36],[37],[39]} So erleichtern kleine Aminosäurereste in Position 2 die Abspaltung, während große sie verhindern.^{[40],[41],[42]} Diese experimentellen Befunde wurden durch Röntgenstrukturanalyse des entsprechenden *E. coli*-Enzyms mit einem peptidähnlichen Inhibitor bestätigt.^[43] So sind nur die ersten beiden Aminosäuren, also P1 und P1', in den Bindetaschen S1 und S1' lokalisiert, während die dritte Aminosäure (P2') bereits nahezu vollkommen lösungsmittel exponiert ist.

Interessanterweise korrelieren die Voraussetzungen zur N-terminalen Methioninabspaltung mit der sogenannten „N-end rule“.^[44] Laut dieser Regel haben Proteine mit großen Aminosäuren an N-terminaler Position 1 eine geringere Halbwertszeit *in vivo* als solche mit kleinen Aminosäureresten. Ein weiterer bemerkenswerter Punkt ist der Zusammenhang

zwischen der Aktivität von Methioninaminopeptidasen und verschiedenen Krankheiten (u. a. Krebs).^{[45],[46]}

1.3 Co- und posttranslationale Modifizierungen

Die unterschiedliche Aminosäuresequenz verschiedener Proteine ist nicht der einzige Grund für die große Diversität ihrer Funktionen. Vielmehr spielen vor allem in eukaryotischen Zellen co- und posttranslationale Modifizierungen eine wichtige Rolle.^[47] Und so ist die NME (siehe 1.2.3) nur ein (vorbereitender) Teil der vielfältigen N-terminalen Modifizierungen.^[48] Weitere wichtige co- und posttranslationale Modifizierungen sind Chromophorbildungen, Acetylierungen des N-Terminus, Amidierungen des C-Terminus, Glycosylierungen, *N*-Myristoylisierungen, *S*-Acylierungen, Hydroxylierungen, Phosphorylierungen sowie die bereits erwähnten Disulfidbrücken, die Cysteinreste inter- und intramolekular ausbilden können usf. (siehe Tab. 4).^[49]

Tab. 4: Übersicht der wichtigsten co- und posttranslationaler Modifizierungen.^[49]

Modifizierung	betrifft	Voraussetzung
NME	N-terminales Met	kleine Aminosäure in Position 2 der Sequenz
<i>N</i> -Myristoylierung	Gly	Gly als N-terminale Aminosäure (NME!) N-terminale Sequenz ist oft: Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Ser/Thr
<i>S</i> -Acylierungen	Cys	keine Sequenzbedingungen bekannt
Hydroxylierung	Pro, Lys, Asp, Asn	Sequenz ist oft Pro-Gly oder Lys-Gly Asp-Asp/Asn-Asp/Asn-Tyr/Phe
Phosphorylierung	Ser, Thr, Tyr	für einzelne Aminosäuren und Kinasen unterschiedlich
Glycosylierung	hauptsächlich Asn und Ser sowie Thr	Asn-Xaa-Ser/Thr

1.3.1 Glycosylierungen

Zu den wichtigsten Modifizierungen gehört die Glycosylierung. Auf Grund der großen Anzahl an chiralen Zentren in Kohlenhydraten und der Möglichkeit, Oligo- und Polysaccharide zu bilden, ist eine nahezu unendliche Vielzahl von verschiedenen Modifizierungen denkbar. Inzwischen ist auch allgemein anerkannt, dass die Glycosylierung einen informativen Charakter, z. B. Regulationsprozesse betreffend, besitzt. Daher spricht man auch in Anlehnung

an den genetischen Code vom „Sugar Code“.^{[50],[51]}

Generell kann man bei der Glycosylierung zwischen *N*- und *O*-Glycosylierung unterscheiden – von geringer Relevanz ist die *C*-Glycosylierung von z. B. Tryptophanresten.^[52] Die *N*-Glycosylierung erfolgt am Amidstickstoff von Asparaginresten, wobei die Aktivierung durch eine Hydroxygruppe in der Umgebung (Asn-Xaa-Ser/Thr) nötig ist.^[49] *O*-Glycosylierungen finden hingegen an Serin- und Threoninresten statt – allerdings können durch eine vorangehende Hydroxylierungen (siehe Tab. 4) auch die entsprechenden Lysin- und Prolinderivate glycosyliert werden. Während bei der *N*-Glycosylierung vornehmlich komplexe Polysaccharidketten kovalent an das entsprechende Protein gebunden werden, tendiert die *O*-Glycosylierung zumindest in höheren Organismen zur Konjugation von Mono-, Di- und Trisacchariden.^[53]

Vor allem die durch *N*-Glycosylierung gebundenen Kohlenhydratstrukturen können einen erheblichen Anteil an der Masse und dem Volumen des jeweiligen Proteins ausmachen. Durch die Möglichkeit der Verzweigung bei Kohlenhydraten entstehen umfangreiche, stark hydrophile Strukturen, die unbestritten die physikalischen Eigenschaften nicht nur der näheren Umgebung der Bindungsstelle Kohlenhydrat-Protein ändern, sondern des gesamten Proteins.^[54] Sie sind aber auch in Transport- und Erkennungsprozesse involviert sowie in die Proteinfaltung und den Schutz vor proteolytischer Spaltung.^{[55],[56]}

Glycosylierungen können aber auch mit Krankheiten wie Krebs, Multipler Sklerose (MS) u. a. in Verbindungen gebracht werden. Oft ist dabei allerdings nicht klar, ob die Glycosylierung Folge oder Ursache der Krankheit ist.^{[57],[58]} Bei der Multiplen Sklerose, auch *Encephalomyelitis disseminata* genannt, handelt es sich um eine Entzündung des zentralen Nervensystems (d. h. des Gehirns und des Rückenmarks), von der Frauen häufiger als Männer betroffen sind. In den meisten Fällen verläuft sie in chronischen Schüben. Die Diagnose von Multipler Sklerose wird durch den sehr unterschiedlichen Krankheitsverlauf eines jeden Patienten erheblich erschwert.

Um die Diagnose effizienter zu gestalten, werden Biomarker benötigt, die z. B. die Antikörper der Autoimmunantwort detektieren können. Dazu können vor allem Peptide dienen.^[59] So hat die Gruppe um LOLLI *et al.* den peptidischen Biomarker CSF114(Glc) entwickelt, der sich strukturell am Myelin-Protein MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) orientiert.^[58] Während sich beim MOG der Aminosäurerest Asn³¹, der die einzige Glycosylierungsstelle darstellt, ungefähr mittig in einem Loop, der zwei β -Faltblätter verbindet, positioniert ist (siehe Abb. 5),^[60] befindet sich der entsprechende Asparaginrest in CSF114(Glc) im Wendepunkt eines β -Turns.^[58] Mit Hilfe einer kompakten Substanzbibliothek ist auf diesem Wege nachgewiesen worden, dass ausschließlich das Glucosederivat des Peptids auf die MS-spezifischen Antikörper ansprach.

Ein großes Problem bei der Analyse von Glycosylierungsmustern von Proteinen ist die Tatsache, dass sich meist ein inhomogenes Bild ergibt (es können mehrere Glycovarianten

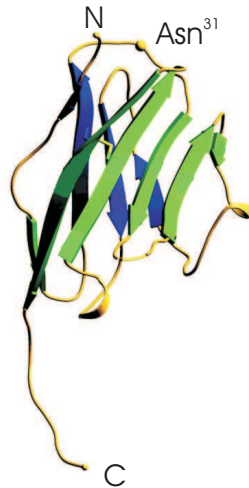


Abb. 5: Dreidimensionale Struktur von MOG mit gekennzeichnetem N- und C-Terminus sowie Asn³¹ (modifiziert nach Breithaupt *et al.*^[60]).

des gleichen Proteins existieren) und es nur sehr schwer gelingt, chemisch über posttranslationale Modifizierungen eine einheitliche Glycosylierung zu erreichen.^[61] Hier könnte der Einsatz von neuen, nicht-kanonischen Aminosäuren zum Erfolg führen. Durch die Einführung zusätzlicher chemischer Funktionalitäten können über orthogonale Reaktionswege – d. h. über Mechanismen, die nicht mit der natürlichen Biochemie interferieren – definierte chemische posttranslationale Modifizierungen positionsspezifisch durchgeführt werden.

1.4 Die Erweiterung des genetischen Codes *in vivo*

Seit über 50 Jahren ist bekannt, dass unter Laborbedingungen auch nicht-kanonische Aminosäuren *in vivo* in Proteine eingebaut werden können.^[3] Wurden diese Aminosäuren jedoch zunächst dazu verwendet, die Funktionsweise verschiedener Enzyme zu untersuchen bzw. Stoffwechselforgänge ganz allgemein aufzuklären, liegt das Hauptaugenmerk bei der Erweiterung des genetischen Codes heute vor allem auf dem sogenannten „Protein Engineering“.^[62] Dabei soll durch den Einsatz von nicht-kanonischen Aminosäuren die Eigenschaft eines Proteins so verändert werden, dass es den Anforderungen in einem neuen Zusammenhang (z. B. intrinsische Fluoreszenz, erhöhte/veränderte Substratspezifität, neue Konjugationsmöglichkeiten etc.) entspricht. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur auch oft von maßgeschneiderten Proteinen gesprochen.^{[62],[63]}

Für eine derartige Proteinsynthese müssen allerdings eine Reihe von Voraussetzungen gegeben sein. So müssen die Zellen die nicht-kanonische Aminosäure aufnehmen und intrazellulär anreichern können. Dazu ist sowohl die chemische als auch die metabolische Stabilität unerlässlich. Außerdem muss ein effizienter Umsatz durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen gewährleistet sein sowie die entsprechende tRNA-Beladung in einer ange-

messenen Geschwindigkeit erfolgen. Schlussendlich muss die nicht-kanonische Aminosäure translatorisch aktiv, d. h. für den Einbau in Proteine geeignet sein. Dazu kann es nötig sein, spezifische Codon-Neuzuordnungen zu definieren.^[62]

Im Großen und Ganzen gibt es zwei methodische Ansätze, um nicht-kanonische Aminosäuren *in vivo* in Proteine einzubauen. Einer von ihnen geht auf die Experimente von CHAPEVILLE und seinen Mitarbeitern zurück.^[64] Während sie versuchten den Einfluss des Genetischen Codes auf die Proteinbiosynthese aufzuklären, konnten sie zeigen, dass falsch acylierte tRNAs (die Beladung erfolgte nicht mit der ihr eigentlich entsprechenden Aminosäure) an der ribosomalen Proteinsynthese teilnehmen können. Aus dieser Beobachtung entwickelte sich die sogenannte „Supressions-basierte Methode“ des Protein Engineerings. Hierbei werden enzymatisch oder chemisch aminoacylierte tRNAs verwendet, deren ursprüngliche Entsprechung der codierenden Einheit unterdrückt ist. Dadurch wird oft ein positionsspezifischer Einbau erreicht.^{[62],[65]} Ein großer Nachteil dieser Methode ist allerdings die nur geringe Ausbeute an maßgeschneidertem Protein. Derzeit ist die Gruppe um SCHULTZ die führende auf diesem Gebiet.^[65]

Weit größere Mengen an modifiziertem Protein kann man allerdings durch die zweite Methode erzeugen, deren Ursprung in Experimenten aus dem Jahr 1955 liegen.^[66] Bei dieser als SPI-Methode (SPI: selective pressure incorporation) bekannten Vorgehensweise werden auxotrophe Zellstämme verwendet. Diese können eine bestimmte Aminosäure nicht selbst herstellen und sind auf die Aufnahme aus dem Medium angewiesen. Außerdem wird die Tatsache ausgenutzt, dass Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zwar zwischen den einzelnen kanonischen, aber nicht unbedingt zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Aminosäuren unterscheiden können. Im Laufe der Evolution brauchte nur zwischen den proteinogenen Aminosäuren und den weiteren in der Zelle vorkommenden Aminosäuren unterschieden werden. Es überrascht daher nicht, dass z. B. Aminosäuren, die dem natürlichen Methionin strukturell und elektronisch ähnlich sind, anstelle von Methionin in Proteine eingebaut werden können.^{[62],[65],[67]}

Um dies zu erreichen, werden die auxotrophen Zellen in einem synthetischen Medium^[68] gezüchtet, das eine limitierte Konzentration an der auszutauschenden Aminosäure aufweist (z. B. Tryptophan). Durch das Zellwachstum wird der Vorrat an Tryptophan aufgebraucht, so dass sich ein stationärer Zustand einstellt. Nun wird die nicht-kanonische Aminosäure (Tryptophananalogon) zum Medium gegeben und die Expression des Zielproteins, dessen Synthese bisher unterdrückt worden ist, induziert. Auf diesem Wege kommt es zwar auf Grund der Inkompatibilität der Analoga mit den zellulären Komponenten zum Erliegen des Zellwachstums, doch die sich nicht weiter teilenden Zellen wirken als Art „Fabrik“ für das gewünschte Protein. In Abb. 6 ist der Vorgang skizziert.

Der große Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass kein positionsspezifischer Einbau erfolgt, sobald die Aminosäuresequenz des Proteins mehrere Reste der auszutauschenden

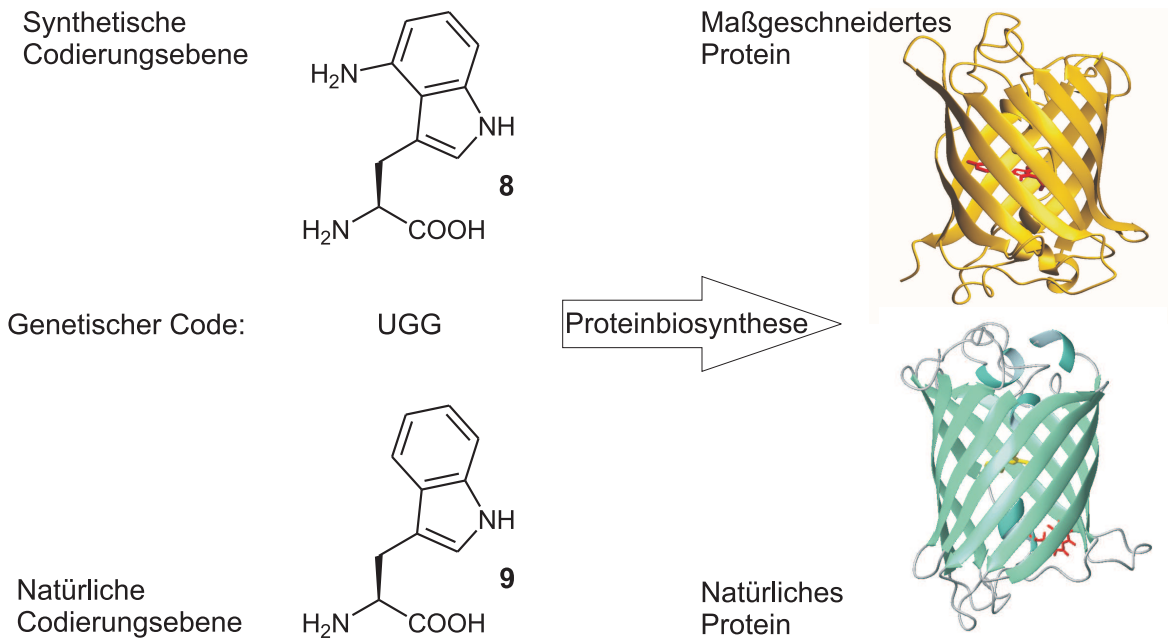


Abb. 6: Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren am Beispiel von Tryptophan und ECFP.^[69] Im genetischen Code steht das Codon UGG für Tryptophan. In LB-Medium oder synthetischem Medium, das nur Tryptophan (9) enthält, exprimieren Tryptophan-auxotrophe Zellen nach der Induktion das cyanfluoreszierende Protein ECFP. Enthält das synthetische Medium allerdings nur eine limitierte Konzentration an Tryptophan und wird dieses durch das Zellwachstum vollständig verbraucht, kann vor der Expressionsinduktion 4-Aminotryptophan (8) zugegeben werden. Auf diesem Wege entsteht das Gold fluoreszierende Protein GdFP.

Aminosäure enthält. Soll z. B. Tryptophan in einem Protein ausgetauscht werden, das drei Tryptophanreste enthält, kann es zu einem statistischen Einbau kommen, d. h., im schlimmsten Fall ist eine heterogene Mischung aller denkbaren Kombinationen in verschiedenen Anteilen das Resultat der Expression. Durch eine genaue Kontrolle der Fermentationsbedingungen kann aber auch in solchen Fällen eine nahezu quantitative Substitution der kanonischen Aminosäure durch ihr Analogon in *E. coli* erreicht werden.^[70] Allerdings kann in diesem Fall nicht eindeutig geklärt werden, welcher Rest welche Auswirkung z. B. auf die Faltung oder die Stabilität des Proteins hat. Ein weiterer Nachteil ist die Tatsache, dass die auszutauschende kanonische Aminosäure und ihr Analogon in etwa die gleiche Struktur und Elektronendichte aufweisen sollten.

1.5 Alkin- und azidfunktionalisierte Aminosäuren

Von großem Interesse sind nicht-kanonische Aminosäuren, deren Einbau in Proteine eine Folgechemie zulässt. Das Repertoire an chemischen Funktionalitäten ist im Fall der kanonischen Aminosäuren stark begrenzt. Vor allem fällt die Abwesenheit von Halogen-, Nitril-, Keto- und Nitrogruppen auf. Darüber hinaus wären Aminosäuren mit ungesättig-

ten Kohlenstoff-Atomen oder Azidgruppen wünschenswert. Es konnten aber entsprechende Aminosäuren durch die in 1.4 beschriebenen Methoden unter Laborbedingungen in Proteine von pro- als auch eukaryotischen Zellen eingebaut werden.^{[62],[65],[67]}

Das Interesse an ungesättigten Aminosäureanaloga und azidhaltigen Aminosäuren lässt sich leicht mit deren vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten erklären, die zum größten Teil orthogonal zur Biochemie lebender Zellen sind.^{[71],[72]} Von besonderem Interesse sind hierbei Reaktionen, die auf der Staudinger-Ligation oder der Huisgen-Cycloaddition beruhen. Bereits im Jahre 1919 berichteten STAUDINGER und MEYER die unter milden Reaktionsbedingungen ablaufende Konvertierung eines Azids zum Amin (siehe Abb. 7).^[73]

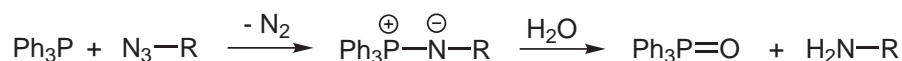


Abb. 7: Mechanismus der Staudinger-Reaktion.

Im Jahr 2000 berichteten sowohl SAXON und BERTOZZI^[74] als auch NILSSON^[75] über den Einsatz der Staudinger-Reaktion zur Bildung einer Amidbindung. Während in der ersten Variante von SAXON und BERTOZZI das entstehende Phosphanoxid noch mit dem Amid verbunden ist, konnte in einer verbesserten („traceless“) Version das Phosphanoxid nach einem Acyltransfer intramolekular abgespalten werden (siehe Abb. 8, X = O).^[76] Einen analogen Mechanismus entwickelte NILSSON (siehe Abb. 8, X = S).

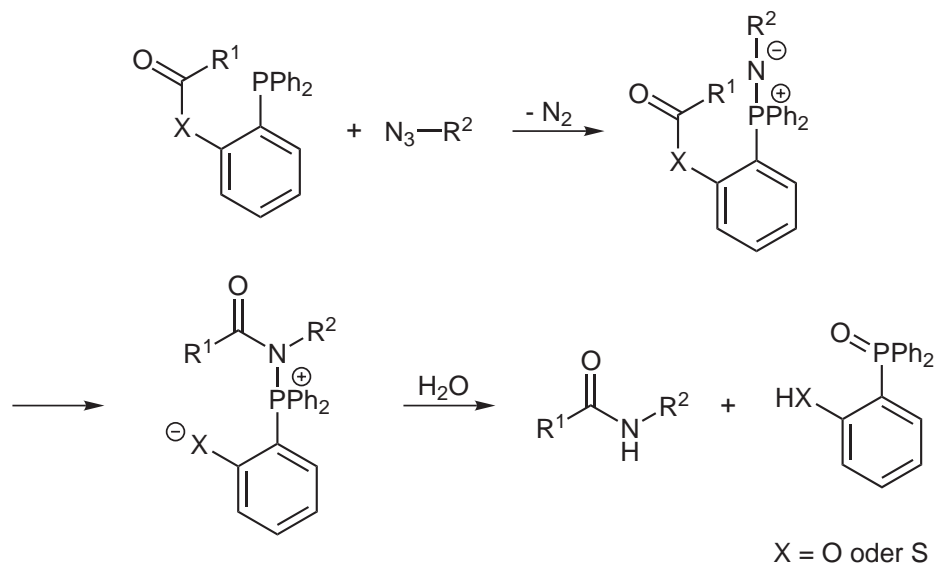


Abb. 8: Mit Hilfe der Staudinger-Reaktion können durch geeignete Reaktionsbedingungen Amidbindungen geknüpft werden.^{[75],[76]}

In Anlehnung an den Begriff „Native Chemical Ligation“^{[77],[78]} wird diese Art der Amidverknüpfung „Staudinger-Ligation“ genannt. Sie stellt eine wichtige Möglichkeit zur Verknüpfung von Peptidfragmenten dar, kann aber auch zur posttranslationalen Modifizierung von Proteinen genutzt werden.^[79]

Eine weitere Möglichkeit der chemischen posttranslationalen Modifizierung beruht ebenfalls auf einer Reaktion, die schon lange in der organischen Chemie bekannt ist. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde erstmals die Reaktion zwischen einem Alkin und einem Azid, bei der Triazole entstehen, beobachtet (siehe Abb. 9).^[80] Aber erst HUISGEN hat sie detailliert beschrieben.^[81] Bei der [3+2]-Cycloaddition (oder 1,3-Dipolaren Cycloaddition) eines ungesättigten Kohlenwasserstoffs (Dipolarophils) mit einem 1,3-Dipol werden zwei σ -Bindungen auf Kosten von zwei π -Bindungen geknüpft. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um einen konzertierten Mechanismus.^[82]

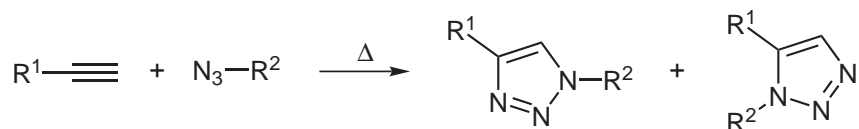


Abb. 9: Mechanismus der [3+2]-Cycloaddition.

Obwohl die Reaktion – vor allem in der Heterocyclenchemie – eine große Bedeutung zur Synthese von Fünfringen hat, ist ihre Durchführung mit Schwierigkeiten verbunden. So sind teilweise hohe Temperaturen notwendig, und in vielen Fällen entsteht ein Produktgemisch aus den beiden möglichen Regioisomeren (siehe Abb. 9).

Daher besitzt die Entdeckung von stereospezifischen und dabei milden, wässrigen Bedingungen für 1,3-Dipolare Cycloadditionen durch SHARPLESS *et al.*^[83] sowie MELDAL und Mitarbeiter^[84] eine große Tragweite. Durch die Katalyse von Cu(I) wird ausschließlich das 1,4-Regioisomer erhalten. Diese Variante wird auch als Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition (CCHC) bezeichnet. Ein weiterer Vorteil ist die 25fach größere Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Staudinger-Ligation.^[85]

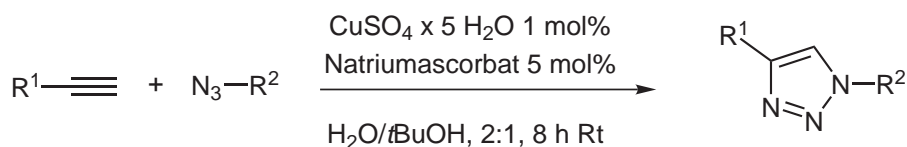


Abb. 10: [3+2]-Cycloaddition nach Sharpless.^[83]

Eine Weiterentwicklung der [3+2]-Cycloaddition für biologische Anwendungen führte zur Entwicklung der sogenannten „Ringspannungs-induzierten Cycloaddition“. Hierbei rea-

giert ein Cyclooctinderivat mit einem organischen Azid.^[86] Auf Grund der hohen Ringspannung im Cyclooctin verläuft die [3,2]-Cycloaddition ohne Verwendung eines Katalysators unter Bildung des 1,2,3-Triazols. Außerdem wird in letzter Zeit die Möglichkeit von Palladium-katalysierten Reaktionen als Alternative zur [3+2]-Cycloaddition intensiv untersucht.^{[87],[88]}

Trotzdem hat die Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition im Moment von den genannten Reaktionen die größte Bedeutung zur chemischen posttranslationalen Modifizierung von Proteinen. Möglich gemacht wird dies durch den *in vivo*-Einbau der nicht-kanonischen Aminosäuren Azidohomoalanin (Aha, **10**) und Homopropargylglycin (Hpg, **11**) anstelle von Methionin. In Abb. 11 sind die Strukturen der beiden Analoga im Vergleich zur kanonischen Aminosäure dargestellt.

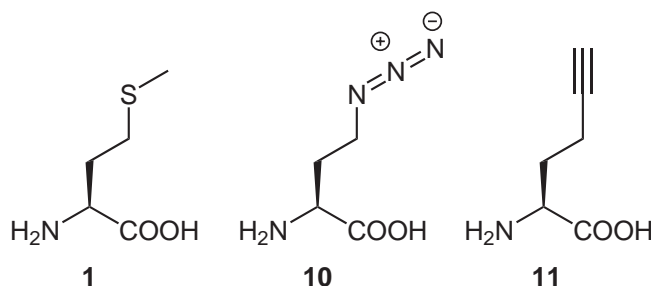


Abb. 11: Strukturformeln der kanonischen Aminosäure L-Methionin (**1**) und seinen Analoga L-Azidohomoalanin (Aha, **10**) und L-Homopropargylglycin (Hpg, **11**).

Die beiden Analoga **10** und **11** konnten durch die SPI-Methode (siehe 1.4) nahezu quantitativ in Modellproteine eingebaut werden.^{[89],[90]} Anschließend konnte eine Reihe von Modifizierungen (z. B. Konjugation von Biotinderivaten, Fluoreszenzfarbstoffen, Kohlenhydraten etc.) an den Modellproteinen durchgeführt werden.^{[91],[92],[93]} Aber auch andere azid- und alkinderivatisierte Aminosäuren konnten durch Zellen in Proteine eingebaut und anschließend weiter funktionalisiert werden.^{[94],[95]}

Im Fall von Aha (**10**) kann sich allerdings das cytosolische Milieu einer Zelle negativ auf die Aminosäure auswirken, da Glutathion die Azid-Gruppe zur Amino-Gruppe reduzieren kann. In höheren Organismen wie z. B. Hefe-Zellen kann es zudem zu einer enzymatischen Reduktion kommen.^[96] In der Literatur gibt es daher neben erfolgreichen Beispielen einer quantitativen Met→Aha-Substitution auch Berichte über die Umwandlung von Aha (**10**) zu 2,4-Diaminobuttersäure. Darüber hinaus kann die Reduktion auch durch Analysemethoden (z. B. MALDI-MS) verursacht werden.^{[89],[97]} Erschwert wird die Reduktion aber, wenn das Zielprotein in Inclusion Bodies exprimiert wird oder sich die zu ersetzenden Methioninreste in einer starren, hydrophoben Umgebung befinden, da Aha an diesen Positionen unzugänglich für Glutathion ist.

1.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Expression und Reinigung von Modellproteinen, deren Methioninreste durch die SPI-Methode mit Methionanaloga substituiert werden sollten. Im Fall von alkin- bzw. azidhaltigen Methioninanaloga sollte besonderes Augenmerk auf die Möglichkeit der posttranslationalen Modifizierung durch die Kupfer-katalysierten Huisgen-Cycloaddition gelegt werden. Einerseits sollte geprüft werden, inwieweit sich die entsprechenden Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugieren lassen, und andererseits sollte die Konjugation mit Kohlenhydraten untersucht werden. Diese Konjugate sollten nach erfolgreicher Reaktion in ihren Eigenschaften näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die Analoga eine Auswirkung auf die N-terminale Prozessierung der Proteine *in vivo* haben.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Peptidische Vorarbeiten zur Etablierung der Kupfer-katalysierten Huisgen-Cycloaddition auf Proteinebene

2.1.1 Synthese eines Peptids mit einem Strukturelement des MOG-Proteins

Ausgehend von MULINACCIS^{[58],[98]} Arbeiten zur Darstellung des MOG-ähnlichen Peptids CSF114(Glc) (**12**, Abb. 12 links) wurde ein Peptid mit folgender Struktur synthetisiert: Ac-TPRVERXGHSVFLAPYGWMVK-NH₂, wobei X für Propargylglycine (Pra) steht (**13**, Abb. 12 rechts).

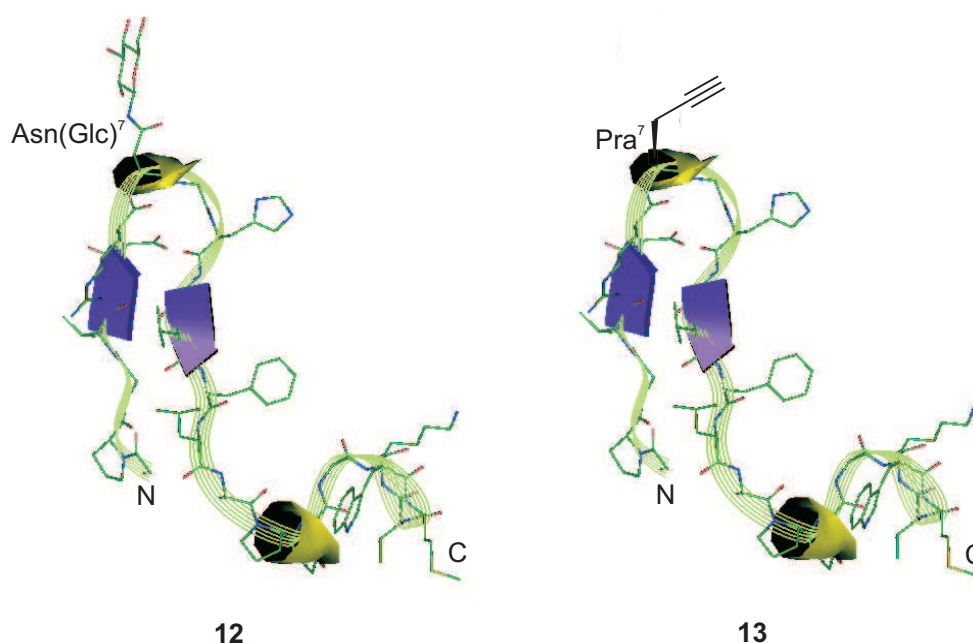


Abb. 12: Links: Ribbon-Diagramm der modellierten Struktur des Peptids CSF114(Glc) (**12**), die durch CD- und NMR-Analysen bestätigt wurde.^[58] Rechts: Angenommene Struktur des CSF114(Glc)-Analog mit Pra⁷ (**13**). In beiden Strukturen sind N- und C-Terminus sowie der Aminosäurerest in Position 7 gekennzeichnet.

Da mit der Substitution in Position 7 (Asn(Glc)→Pra) nur eine Veränderung in der Sequenz vorgenommen worden ist, kann angenommen werden, dass die für CSF114(Glc) ermittelte bevorzugte Struktur in wässriger Lösung^[58] weitestgehend erhalten bleibt. Dies ist von Bedeutung, da gezeigt worden ist, dass die Konformation des β -Turns wichtig für die Erkennung durch den Antikörper ist.^[58] Der Austausch von Asn(Glc)⁷ mit Propargylglycine ermöglicht allerdings die Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition (CCHC, siehe 1.5). Diese kann genutzt werden, um organische Moleküle, die eine Azidgruppe tragen (z. B. Kohlenhydrate oder Fluoreszenzfarbstoffe), mit dem Peptid zu verknüpfen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass statt einer Serie von Peptiden mit unterschiedlich

derivatisierten Aminosäuren nur ein einziges Peptid hergestellt werden muss, dessen Alkylseitenkette anschließend zur Reaktion gebracht werden kann.

Zwar deuten die Arbeiten von LOLLI *et al.*^[58] darauf hin, dass der Glucoserest essentiell für die Antikörper-Bindung ist, doch hat sich die Versuchsreihe auf einige wenige Kohlenhydrate beschränkt. Mit Hilfe der CCHC ist vielleicht ein synthetisch einfacher Zugang zu systematischen und verlässlichen Substanzbibliotheken gegeben. Allerdings gilt es zu klären, inwieweit sich der größere sterische Bedarf des Fünfrings im Gegensatz zur glycosidischen Bindung auswirkt. Vielversprechend sind hier aber Berechnungen von SHARPLESS *et al.*, die ergeben, dass Substituenten des Triazolringes, die mit den Atomen 1 und 4 verknüpft sind, untereinander einen Abstand von ca. 5 Å haben und somit einen ähnlichen Abstand aufweisen wie zwei Atome, die durch eine Amidbindung (3,8 Å) verknüpft sind (siehe Abb. 13).^[99] Da in CSF114(Glc) die Peptidkette N-glycosidisch über Asn⁷ mit dem Zucker verbunden ist, sollte der Abstand zwischen dem β -Kohlenstoff-Atom des Asn⁷ und dem C¹ des Kohlenhydrats ebenfalls in etwa den Abständen des Triazolrings entsprechen.

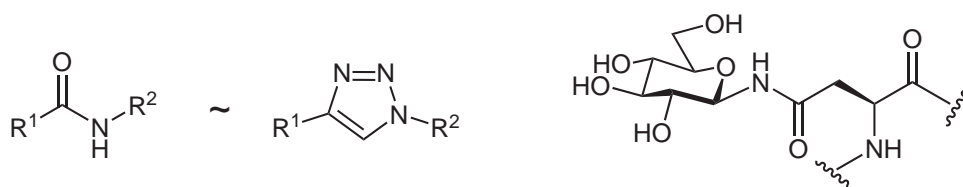


Abb. 13: Die Abstände zwischen R¹ und R² sind im Amid (links) und 1,4-Triazol (Mitte) ungefähr gleich groß.^[99] In der gleichen Größenordnung sollte auch der Abstand zwischen dem C¹ des Sechsrings und dem β -Kohlenstoff-Atom des Asparagins liegen (rechts).

Die Synthese des Peptids **13** erfolgte nach der Fmoc/*t*Bu-Strategie und wurde an einem Durchflusssynthesizer durchgeführt. Dabei wurden gute Ausbeuten an Rohprodukt erzielt – allerdings in einer nur durchschnittlichen Reinheit. Um diese zu erhöhen, wurden in einer folgenden Synthese Doppelkupplungen für Arginin und Valin durchgeführt. Allerdings führte diese Maßnahme nicht zum gewünschten Erfolg und so wurde bei weiteren Synthesen auf eine Doppelkupplung verzichtet.

Die Aufreinigung des Rohprodukts mittels präoperativer RP-HPLC verlief problemlos. Ein Nachteil war allerdings der dadurch entstandene Verlust an Ausbeute; diese betrug nach der Reinigung nur noch ca. 30 %. Daher wurden außer den eindeutig hochreinen Fraktionen (ESI-MS-Analyse) zusätzlich auch die bei der Reinigung anfallenden Mischfraktionen gesammelt. Diese dienten als Ausgangsmaterial für die ersten Versuche zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für die CCHC.

2.1.2 Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition des Peptids mit azidfunktionalisierten Kohlenhydraten

Um zu testen, ob **13** überhaupt mit einem Azidozucker reagiert, wurden das Peptid und 1-Azido-1-deoxy- β -D-glucopyranosid-tetraacetat (**14a**) in einem äquimolaren Verhältnis in einem H₂O/*t*BuOH-Gemisch (1:1) gelöst sowie mit einem Überschuss an CuSO₄-Pentahydrat und L-Ascorbinsäure versetzt (Abb. 14, R = Ac).

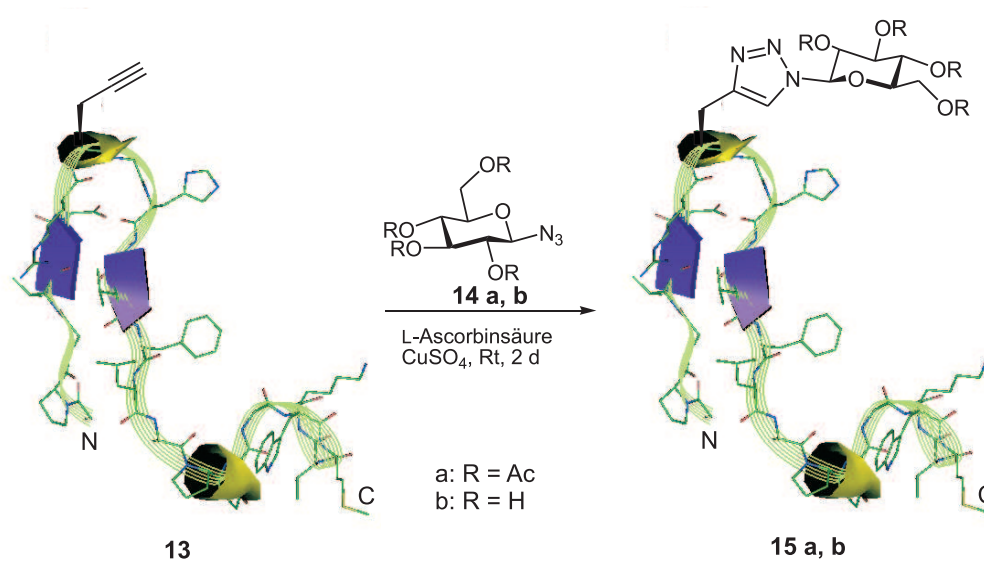


Abb. 14: Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition zwischen dem Modellpeptid (**13**) und 1-Azido-1-deoxy- β -D-glucopyranosid-tetraacetat (**14a**) sowie 1-Azido-1-deoxy- β -D-glucopyranosid (**14b**).

Nachdem für zwei Tage bei Raumtemperatur geschüttelt wurde, konnte aus den Chromatogrammen der analytischen RP-HPLC geschlossen werden, dass sich **13** nahezu vollständig zu **15a** umgesetzt hatte. Die Unterschiede zwischen **13** und **15a** in der Retentionszeit während der analytischen RP-HPLC sind in Abb. 15 deutlich zu erkennen. Die HPLC-Probe von **15a** wurde unverändert zusätzlich mittels LC-MS-Spektrometrie untersucht, die die fast quantitative Umsetzung bestätigte.

Da für anschließende Untersuchungen ein Kohlenhydrat mit freien Hydroxygruppen benötigt wurde, wurde im Folgenden das ebenfalls kommerziell erhältliche 1-Azido-1-deoxy- β -D-glucopyranosid (**14b**) eingesetzt (siehe Abb. 14, R = H). Des Weiteren wurde auch nicht mehr mit einem Überschuss an CuSO₄ und Ascorbinsäure gearbeitet, sondern mit jeweils ca. 50 mol% (Ansatzgröße: 4 μ mol, CuSO₄: 2,1 μ mol, Ascorbinsäure: 1,8 μ mol). Die analytische RP-HPLC bestätigte einen nahezu quantitativen Verlauf der Reaktion.

Die Reinigung des Peptids **15b** erfolgte wiederum mit Hilfe der präparativen RP-HPLC. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Massenspektrometrie analysiert, ihrer Reinheit entsprechend vereinigt und lyophilisiert.

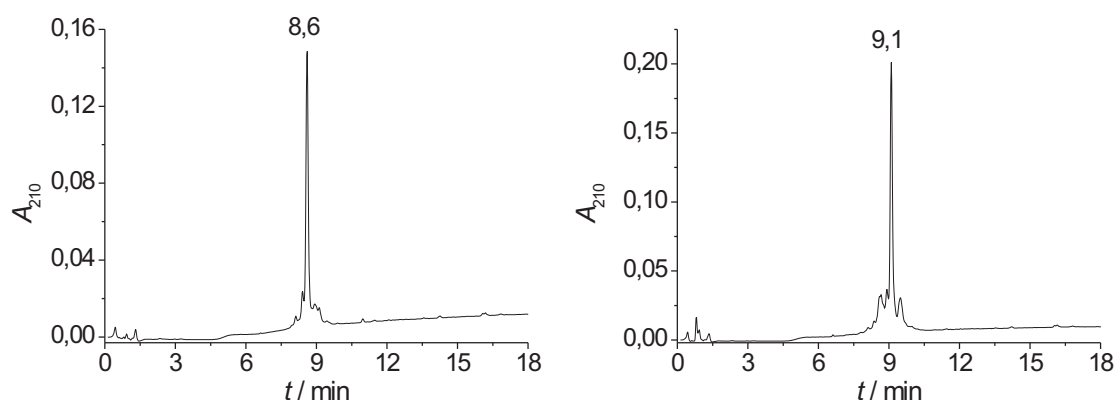


Abb. 15: Links: Chromatogramm der analytischen RP-HPLC (aHPLC1) von **13**. Rechts: Chromatogramm der analytischen RP-HPLC (aHPLC1) von **15a**.

In Abb. 16 ist das Chromatogramm der analytischen RP-HPLC der vereinigten Fraktionen (links) sowie das entsprechende ESI-MS-Spektrum (rechts) gezeigt, dessen Signale dem zwei-, drei- und vierfach geladenen Produktmolekül entsprechen ($m_{ber}^{2+} = 1337.0$ Da, $m_{ber}^{3+} = 891.6$ Da, $m_{ber}^{4+} = 669.0$ Da).

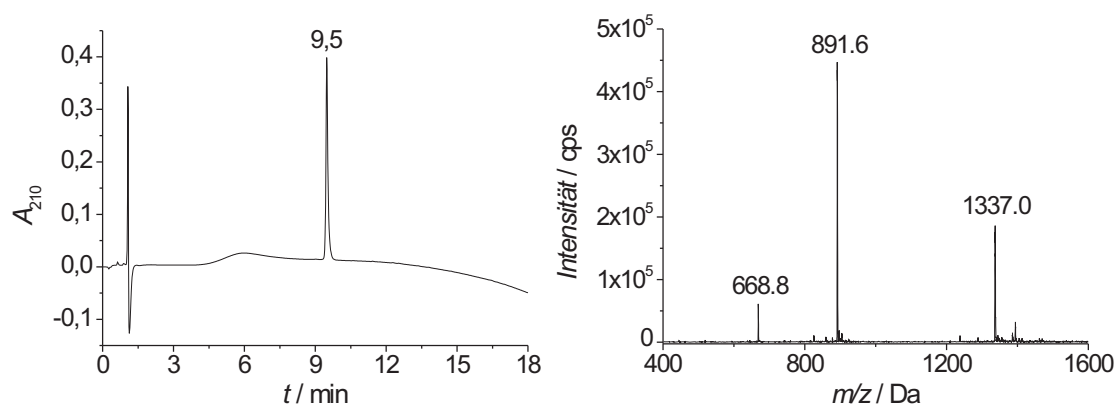


Abb. 16: Links: Analytische RP-HPLC (aHPLC2) des Peptids **15b** nach der Reinigung. Rechts: ESI-MS-Spektrum des glykokonjugierten Peptids ($m_{ber} = 2672$ Da, detektiert wurde das zwei-, drei- und vierfach geladene Produktmolekül).

Die beschriebene Synthese und vor allem die Konjugation mit einem Kohlenhydrat liefern wichtige Erkenntnisse für die posttranslationale Modifizierung von Proteinen. Diese soll im Weiteren näher beschrieben werden. Zunächst aber soll überprüft werden, ob **15b** die gleichen Eigenschaften im Hinblick auf die Erkennung von MS-spezifischen Antikörpern wie CSF114(Glc) besitzt.

2.1.3 ELISA-Tests mit dem konjugierten Glycopeptid

Da von CSF114(Glc) bekannt ist, dass es MS-spezifische Antikörper im Serum von Patienten erkennt,^[58] sollte ein sogenannter indirekt kompetitiver ELISA durchgeführt werden. Dazu wurde CSF114(Glc) immobilisiert und mit einem Gemisch aus Serum und **15b** inkubiert. Als Kontrolle diente ein Serum, dem CSF114(Glc) zugesetzt wurde. In Abb. 17 ist das Resultat für jeweils verschiedene Peptidkonzentrationen gezeigt.

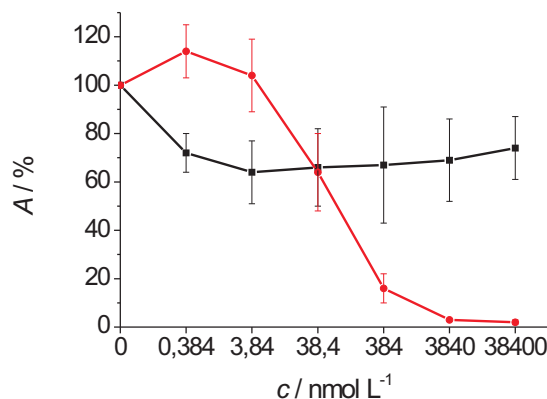


Abb. 17: Indirekt kompetitiver ELISA von CSF114(Glc) (rot) und **15b** (schwarz). Im Fall von **15b** kann keine besondere Affinität zu den Antikörpern festgestellt werden.

Wie eindeutig zu erkennen ist, stehen CSF114(Glc) und das Glycokonjugat **15b** nicht in Konkurrenz zueinander, d. h., trotz der großen Ähnlichkeit der Peptide wird **15b** schwächer von den Antikörpern gebunden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der Triazolring doch nicht gut genug die glycosidische Bindung in CSF114(Glc) nachahmt und durch die sterischen Unterschiede eine Antikörpererkennung unterbleibt. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass **15b** doch eine andere Sekundärstruktur besitzt als CSF114(Glc). Allerdings ist eine Erkennung von IgM-Antikörpern detektiert worden, die derzeit weiter untersucht wird.

2.2 Synthese von Methioninanaloga

Trotz der teils negativen ELISA-Ergebnisse in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Peptide CSF114(Glc) und **15b** sollten die generellen Möglichkeiten der Kupfer-katalysierten Huisgen-Cycloaddition in *in vivo*-Experimenten überprüft werden. Dazu sollte in Modellproteinen Methionin (**1**) durch die SPI-Methode (siehe 1.4) mit L-Azidohomoalanin (Aha, **10**), L-Azidoalanin (Aza, **12**) und L-Homopropargylglycin (Hpg, **11**) substituiert werden. Die Strukturformeln der Aminosäuren sind in Abb. 18 gezeigt. Auf eine Substitution Met→Pra wurde verzichtet, da bekannt ist, dass Pra *in vivo* nicht translatiert wird.

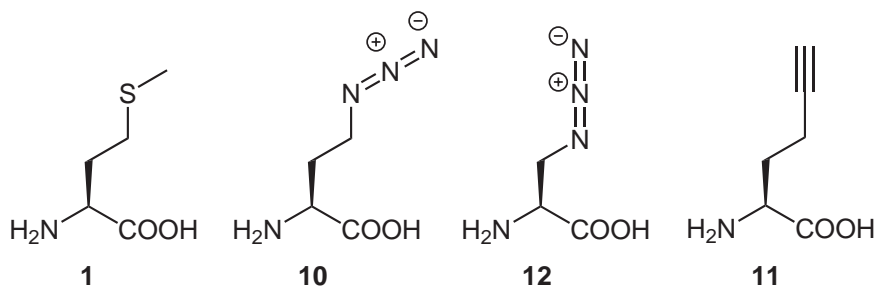


Abb. 18: Strukturen von Met (1) und seinen Analoga Aha (10), Aza (12) und Hpg (11).

Das in dieser Arbeit verwendete Hpg (11) wurde von der Firma CHIRALIX (Nijmegen, NL) zur Verfügung gestellt. Aha (10) und Aza (12) hingegen wurden chemisch sowie enzymatisch synthetisiert.

2.2.1 Chemische Synthese von L-Azidoalanin

In Abb. 19 ist der Syntheseweg für die chemische Synthese von 12 dargestellt, der der Vorschrift von MANGOLD *et al.*^[100] entlehnt ist.

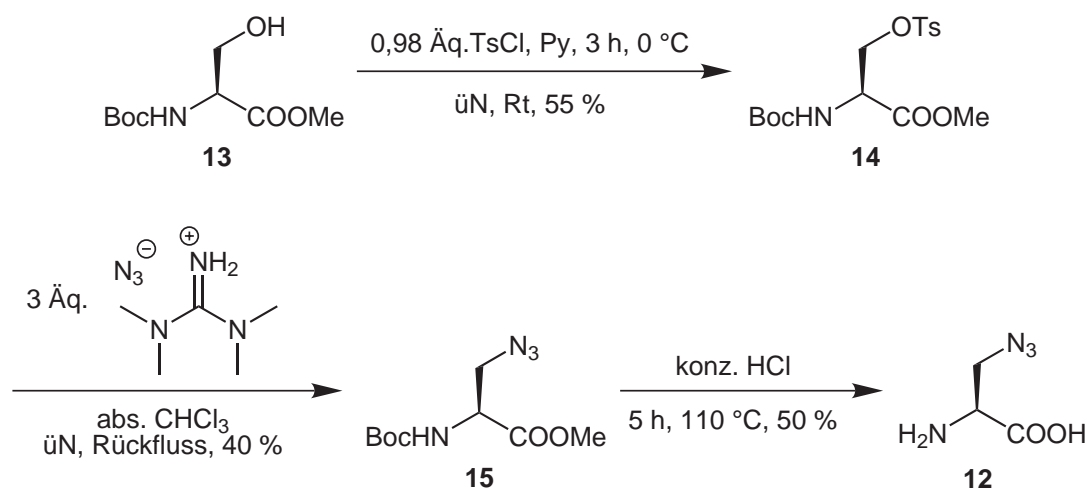


Abb. 19: Chemische Synthese von Aza.

Allerdings wurde bei der Synthese von einem teilweise geschützten Serinderivat (13) ausgegangen, dessen noch freie OH-Gruppe durch Tosylierung in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt wurde. Diese wurde im Folgeschritt mit einem Azid substituiert, worauf die Abspaltung der C- und N-terminalen Schutzgruppen im saueren Milieu erfolgte. Der

Nachteil dieser Strategie ist die geringe Ausbeuten jeder Stufe und somit eine zu geringe Gesamtausbeute (11 %). Allerdings konnte L-Azidoalanin enantiomerenrein gewonnen werden (siehe 2.2.3).

2.2.2 Enzymatische Synthese von L-Azidoalanin

2.2.2.1 Isolierung und Expression von *O*-Acetylserinsulphydrolase-A

Um die Synthese des L-Azidoalanins (**12**) zu vereinfachen und effizienter zu gestalten, sollte versucht werden, die Aminosäure enzymatisch herzustellen. Dabei konnte auf die Literatur über die *O*-Acetylserinsulphydrolase (OASS) und deren geringe Substratspezifität zurückgegriffen werden.^{[101],[102]} Das Enzym (EC 2.5.1.47) spielt eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Cystein sowie im Schwefel- und Selenoaminosäuremetabolismus. Es wird zwischen zwei Isoformen des Enzyms unterschieden: OASS-A (Gen: *cysK*) und OASSA-B (Gen: *cysM*). Interessanterweise sind bei *cysK* und *cysM* nur 45 % der Sequenz identisch und *cysK* ist wesentlich stärker in Pflanzen und Bakterien verbreitet als *cysM*.^[101] In Abb. 20 ist die Struktur von OASS-A, die in der Natur als Dimer vorliegt, gezeigt. Die dreidimensionale Struktur des Proteins ähnelt der der Tryptophan Synthase- β aus *Salmonella typhimurium*, obwohl weniger als 20 % der Sequenzen identisch sind und einige Strukturelemente fehlen.^[103]

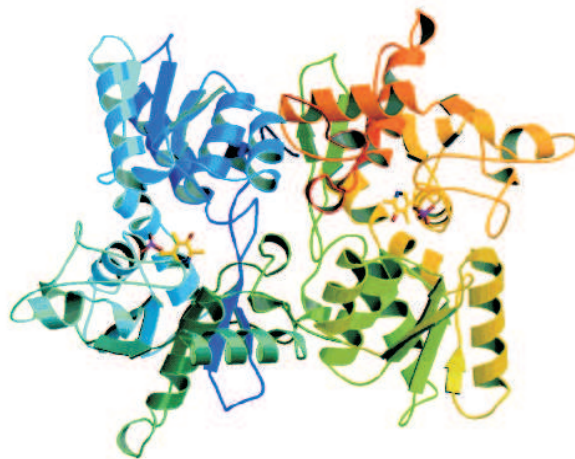


Abb. 20: Ribbon-Diagramm des OASS-A-Dimers. Das Monomer-Dimer-Zentrum befindet sich in der Mitte der Abbildung. Die Monomere sind verschiedenfarbig dargestellt (blaugrün und orange-grün). Die Darstellung erfolgt aus Sicht des Lösungsmittels zum aktiven Zentrum hin. Der Cofaktor PLP ist jeweils in Stäbchenform dargestellt.^[104]

In einer von Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) abhängigen Reaktion katalysiert OASS die β -Substitution des *O*-Acetyl-L-serins. In der Natur führt diese Substitution der Acetylgruppe durch ein anorganisches Sulfid zur Aminosäure Cystein. Durch die schon erwähnte geringe Substratspezifität lassen sich *in vitro* auch weitere Aminosäuren herstellen.^{[101],[102]}

Das Gen für OASS-A wurde aus genomischer DNA von *E. coli*-Zellen (DH5 α) mittels PCR isoliert und in den Vektor pRSETH6H ligiert. Dieser Vektor wurde gewählt, da der in-frame-6 \times His-Tag eine einfache Reinigung des rekombinanten Proteins ermöglicht. Der resultierende Vektor wurde pRSETH6HcysK genannt, und im Vergleich zum Wildtyp-Protein enthält das rekombinante Protein (rOASS-A) die Aminosäuresequenz AHHHHH-HGS zwischen Met¹ und Ser², wodurch sich die Masse des Proteins von 34,5 kDa^{[105],[106]} auf 35,5 kDa vergrößert. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass durch Ala² das N-terminale Met¹ *in vivo* durch das Enzym *EcMetAP* (siehe 1.2.3) abgespalten wird und sich somit eine tatsächliche Masse von 35,4 kDa ergibt. Nach der erfolgreichen DNA-Präparation des Expressionsplasmids und Transformation durch Elektroporation erfolgte die Testexpression in den *E. coli*-Zellstämmen B834(DE3) und BL21(DE3) bei 30 °C über Nacht (Details siehe 4). In Abb. 21 ist das Gel der entsprechenden Zellysate gezeigt.

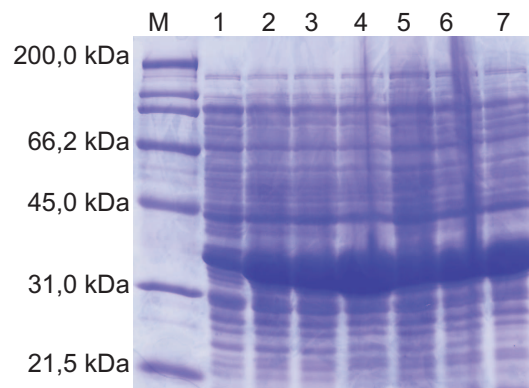


Abb. 21: Coomassie gefärbtes 12%iges Gel nach SDS-PAGE. M: Molekulargewichtsstandard; 1: BL21(DE3) nicht induziert; 2 – 4: BL21(DE3) induziert (1 mM IPTG, 30 °C); 5 – 7: B834(DE3) induziert (1 mM IPTG, 30 °C).

Wie sehr gut zu erkennen ist, exprimieren alle ausgewählten Klone beider Zellstämme ein Protein, das eine Größe zwischen 31 und 45 kDa aufweist. Da für rOASS-A eine Größe von 35,4 kDa berechnet worden ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das gewünschte Protein handelt. Im nächsten Schritt sollte das Protein in großer Kultur (1-L-Maßstab) überexprimiert werden. Dafür wurden wieder Kulturen beider Zellstämme angezchtet, mit IPTG induziert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Allerdings konnte hierbei keine Überexpression im Gel detektiert werden (nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurden erneut *E. coli*-Zellen (B834(DE3) und BL21(DE3)) mit dem Vektor pRSETH6HcysK transformiert und ein weiterer Expressionstest durchgeführt. Diesmal wurden die Zellen allerdings nach der Induktion mit IPTG bei unterschiedlichen Temperaturen (25 °C, 30 °C, 37 °C) über Nacht inkubiert. Dabei bestätigte sich, dass eine Temperatur von 30 °C optimal für die Expression von rOASS-A ist (Gel nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob eine Über-Nacht-Expression sich negativ auf die Proteinausbeu-

te auswirkt, z. B. auf Grund eines enzymatischen Abbaus durch Proteasen, wurde eine zeitaufgelöste Testexpression mit neu transformierten Zellen durchgeführt. In Abb. 22 ist eine deutliche Zunahme der Intensität der Bande oberhalb von 31 kDa in Abhängigkeit von der Zeit zu erkennen. Durch N-terminale Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Protein einen 6×His-Tag aufweist. Dadurch bestätigte sich die Vermutung, dass es sich bei dem überexprimierten Protein um rOASS-A handelt.

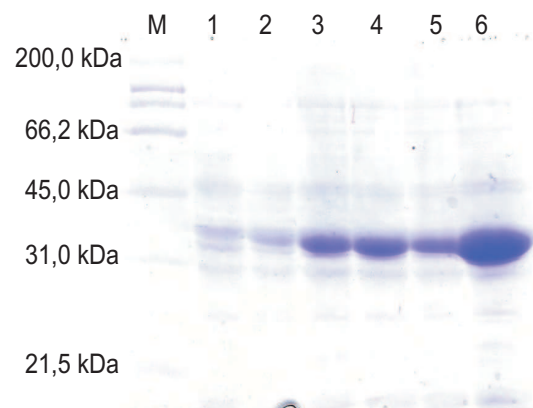


Abb. 22: Coomassie gefärbtes 12%iges Gel nach SDS-PAGE. M: Molekulargewichtsstandard; 1: BL21(DE3) nicht induziert; 2 – 6: BL21(DE3) induziert (1mM IPTG, 30 °C [2: 1 h; 3: 2 h; 4: 3 h; 5: 4 h; 6: üN]).

Da alle Testexpressionen reproduzierbar eine eindeutige Überexpression nach einer Über-Nacht-Inkubation bei 30 °C gezeigt hatten, wurde erneut versucht, rOASS-A in großer Kultur zu exprimieren. Da auch dieser Versuch fehlschlug, wurden Veränderungen hinsichtlich des Verhältnisses von Luft zu Medium vorgenommen. In den Testexpressionen beträgt das Volumen der Zellsuspension 1 mL und das der Luft 0,5 mL (1,5 mL Reaktionsgefäße der Firma EPPENDORF, Hamburg, D). Bei den Expressionsversuchen in größerem Maßstab wurde aber ein Kulturvolumen von 1 L in einem 5-L-Kolben verwendet, in den darüber hinaus noch Schikanen zur verbesserten Luft-Medium-Durchmischung eingearbeitet sind. Da im letzteren Fall in keinem Versuch eine Überexpression erreicht worden war, wurde versucht, die Bedingungen der Testexpression möglichst exakt auf ein größeres Kulturvolumen zu übertragen. Dazu wurden 700 mL Zellsuspension des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) in einen 1-L-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen überführt und nach der Induktion mit IPTG bei 30 °C über Nacht inkubiert.

Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand mittels Ni-NTA-Chromatographie gereinigt (Details siehe 4). In Abb. 23 sind die Reinigungen von zwei Expressionsversuchen (A und B) in einem Gel dargestellt.

Wie eindeutig zu erkennen ist, kann rOASS-A durch Ni-NTA-Chromatographie gereinigt werden. Im Durchschnitt werden Ausbeuten von ca. 15 mg L⁻¹ erzielt, wobei die Reinheit bis zu 99 % betragen kann (die Abschätzung der Reinheit erfolgte durch den Vergleich

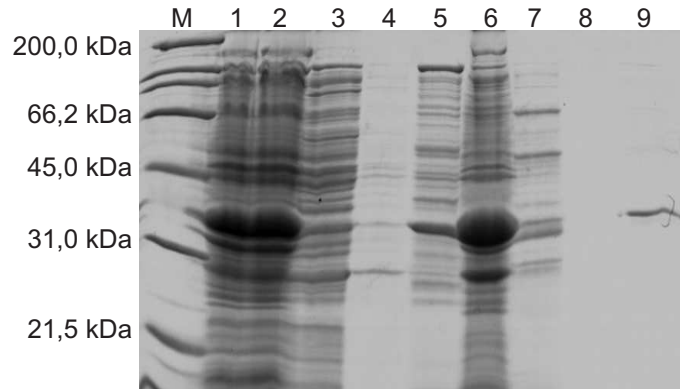


Abb. 23: Coomassie gefärbtes 12%iges Gel nach SDS-PAGE der Zellysate. M: Molekulargewichtsstandard; 1 – 5: Zellysate A; 6 – 9: Zellysate B wobei 1,2,6: Pellet nach Zellaufschluss, 3,7: Durchlauf der löslichen Fraktion während der Ni-NTA-Chromatographie, 4,8: Waschschrift der Ni-NTA-Chromatographie; 5,9: Eluate der Ni-NTA-Chromatographie.

der Intensitäten der Produktbande und der Nebenbanden). In Abb. 24 ist sowohl ein Gel des gereinigten Proteins sowie das korrespondierende ESI-MS-Spektrum gezeigt. Durch Letzteres konnte die Proteinidentität einwandfrei nachgewiesen werden.

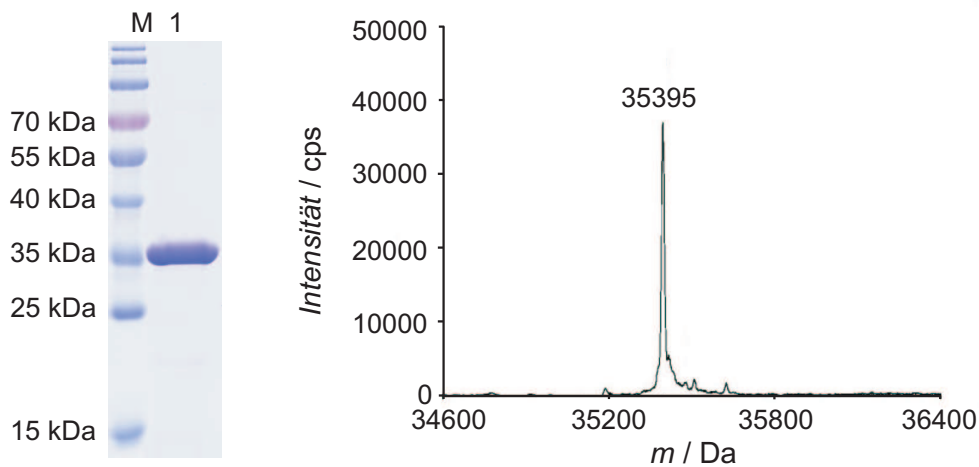


Abb. 24: Links: Coomassie gefärbtes 12%iges Gel nach SDS-PAGE. M: Molekulargewichtsstandard; 1: rOASS-A (gereinigt). Rechts: Durch Dekonvolution erhaltenes ESI-MS-Spektrum des gereinigten Proteins ($m_{ber} = 35396$ Da).

Abschließend wurde auch noch ein Löslichkeitstest durchgeführt, da aus Abb. 23 deutlich wird, dass sich auch im Zellpellet rOASS-A angereichert hat (Spuren 1, 2 und 6). Aus diesem Grund wurde eine induzierte Zellsuspension ($V = 5$ mL) nach Über-Nacht-Inkubation zentrifugiert und durch die Anwendung von Ultraschall aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die lösliche Fraktion mit Lämmli-Auftragspuffer^[107] versetzt und der unlösliche Rückstand in 6 M Harnstoff aufgenommen. Nach fünf Minuten Inku-

bationszeit bei Raumtemperatur wurde auch diese Probe mit Lämmli-Auftragspuffer^[107] versetzt und eine SDS-PAGE durchgeführt. In Abb. 25 ist das entsprechende Gel gezeigt. Bei der Auswertung ist zu beachten, dass vom Überstand (Spur 2) etwa die doppelte Probenmenge aufgetragen wurde. Es kann daher angenommen werden, dass sich 2/3 des Proteins in Inclusion Bodies und 1/3 des Proteins in der löslichen Fraktion befand.

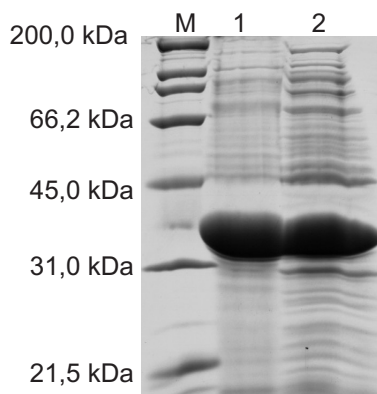


Abb. 25: Coomassie gefärbtes 12%iges Gel nach SDS-PAGE. M: Molekulargewichtsstandard; 1: Pellet; 2: Überstand. Da vom Überstand doppelt soviel Lösung aufgetragen worden ist und die Banden ähnlich intensiv sind, kann von einer Verteilung Inclusion Bodies zu löslichem Protein von 2:1 ausgegangen werden.

Durch eine Veränderung der Standardexpressionsbedingungen des Arbeitskreises (siehe 4) konnte die *O*-Acetylserinsulphhydrolase (rOASS-A) überexprimiert werden. Obwohl nahezu 66 % des Proteins in Inclusion Bodies exprimiert werden, ist die Menge an Protein in der löslichen Fraktion mit ca. 15 mg L^{-1} ausreichend. Daher wurde nach dem Zellaufschluss immer nur mit dem Überstand weitergearbeitet und das Pellet verworfen. Des Weiteren erwies sich das Protein als äußerst stabil und konnte über zwei Jahre bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ohne nennenswerte Präzipitation gelagert werden.

2.2.2.2 Aktivitätsassay für rOASS-A

Die bereits erwähnte geringe Substratspezifität kann u. a. dazu genutzt werden, um die Aktivität der *O*-Acetylserinsulphhydrolase zu bestimmen. Die von TAI^[108] entwickelte Methode geht dabei von 5-Mercapto-2-nitrobenzoat (TNB) als Substrat aus. Durch die OASS-katalysierte Reaktion mit *O*-Acetyl-L-serin entsteht daraus *S*-(3-Carboxy-4-nitrophenyl)-L-cystein (**18**, siehe Abb. 26). Der Reaktionsfortschritt kann spektroskopisch anhand sich ändernder UV/Vis-Absorptionsintensitäten verfolgt werden. Bei fortschreitender Reaktion kommt es zu einer Intensitätsabnahme bei 412 nm (Umsatz von **17**) und zu einer Intensitätszunahme bei 340 nm (Bildung von **18**).

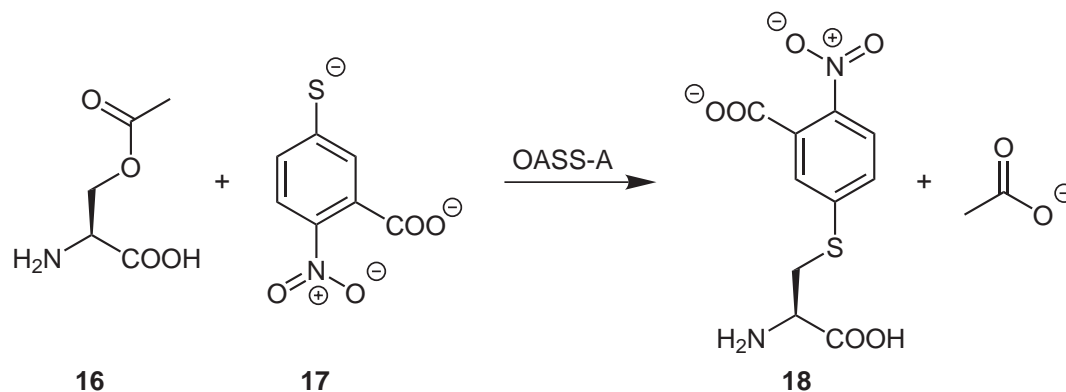


Abb. 26: Darstellung von *S*-(3-Carboxy-4-nitrophenyl)-L-cystein zur Bestimmung der Aktivität der *O*-Acetylserinsulphydrolase.^[108]

Da keine detaillierte Enzymcharakterisierung erfolgen sollte, wurde von der Durchführung einer quantitativen Bestimmung der Aktivität von rOASS-A abgesehen und nur eine qualitative Analyse durchgeführt. Dabei wurden Spektren vor der Substratzugabe zur Reaktionsmischung sowie nach 0, 10, 190 und 1100 min aufgenommen wurden (siehe Abb. 27). Wie deutlich zu erkennen ist, erfolgt eine Umsetzung von *O*-Acetyl-L-serin und TNB durch Katalyse von rOASS-A.

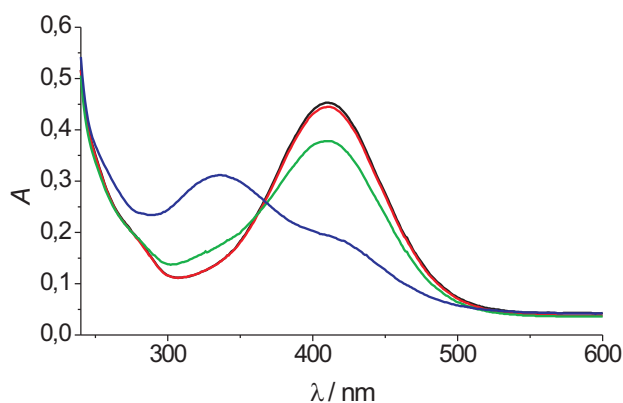


Abb. 27: Aktivitätsassay nach TAI *et al.*^[108] Es wurde mit folgenden Endkonzentrationen gearbeitet: 100 mM HEPES (pH = 7), 50 μ M TNB, 4 mM *O*-Acetylserin und 0,8 μ M rOASS-A. Die UV/Vis-Spektren wurden 0 (schwarz), 10 (rot), 190 (grün) und 1100 (blau) min nach der Zugabe von *O*-Acetyl-L-serin aufgenommen.

2.2.2.3 rOASS-A-katalysierte Darstellung von L-Azidoalanin

Nachdem das Enzym rOASS-A in hoher Reinheit und aktiver Form in einer ausreichenden Menge hergestellt worden war, sollte es die Umsetzung von *O*-Acetyl-L-serin (**19**) und

Natriumazid zu L-Azidoalanin (Aza, **12**) katalysieren. Dazu wurden die Edukte in Phosphatpuffer gelöst, mit rOASS-A versetzt und über Nacht geschüttelt (siehe Abb. 28). Nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie verblieben 90 % reines **12**.

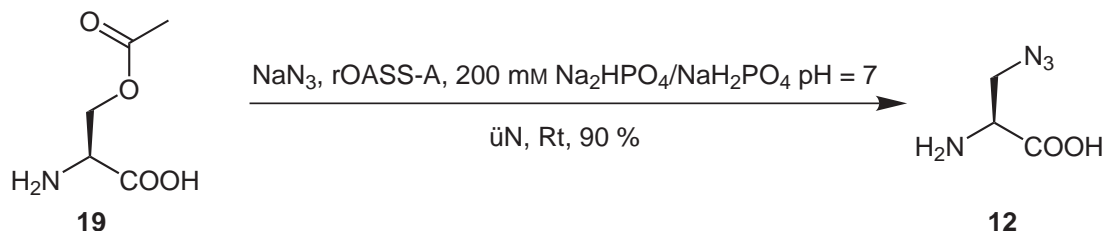


Abb. 28: Enzymatische Synthese von Aza.

2.2.3 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses der dargestellten L-Azidoalanine

Bei der enzymatischen Aza-Synthese wurde von *O*-Acetyl-L-serin ausgegangen. Daher wurde angenommen, dass es sich bei dem Produkt **12** ebenfalls um eine L-Aminosäure handelt, da die Umsetzung bei Raumtemperatur erfolgte, das Stereozentrum an der Reaktion nicht beteiligt war und L-Aminosäuren die natürlichen Substrate und Produkte der Reaktion darstellen. Dennoch sollte durch die Umsetzung mit Marfey's Reagenz^[109] diese Annahme überprüft werden. Zudem sollte auch das auf chemischem Wege synthetisierte Aza dieser Prüfung unterzogen werden. Hier wurde zwar auch eine L-Aminosäure als Edukt verwendet, doch wurde im Verlauf der Darstellung zweimal auf ca. 100 °C erhitzt. Die erhöhte Temperatur kann unter Umständen zu einer Racemisierung führen. In Abb. 29 ist die Reaktion eines Racemats mit Marfey's Reagenz abgebildet. Durch die Umwandlung eines Enantiomers in ein Diastereomer kann die (L,L)-Form von der (D,L)-Form chromatographisch getrennt werden. Da **21** enantiomerenrein eingesetzt wird, kann vom *de*-Wert des Diastereomers auf den *ee*-Wert des Enantiomers, in diesem Fall der Aminosäure, geschlossen werden.

Zur Bestimmung eines geeigneten Lösungsmittelgradienten wurden zunächst Experimente mit derivatisiertem L-Norleucin und D,L-Norleucin durchgeführt. Im Fall von D,L-Norleucin konnten die beiden Diastereomere basisliniengetrennt voneinander isoliert werden ($t_R = 24,8$ min für das L-Norleucinderivat und $t_R = 28,5$ min für das D-Norleucinderivat). Dabei bestätigte sich auch, dass L-Aminosäuren in der Regel schneller als ihre D-Enantiomere eluieren.^[109]

In Abb. 30 sind die RP-HPLC-Chromatogramme für das chemisch (links) und das enzymatisch (rechts) synthetisierte Aza (**12**) dargestellt. Das Signal bei $t_R = 6,6$ min konnte dem Reagenz **21** zugeordnet werden. Wie in den Spektren zu sehen, wurde in beiden Fäl-

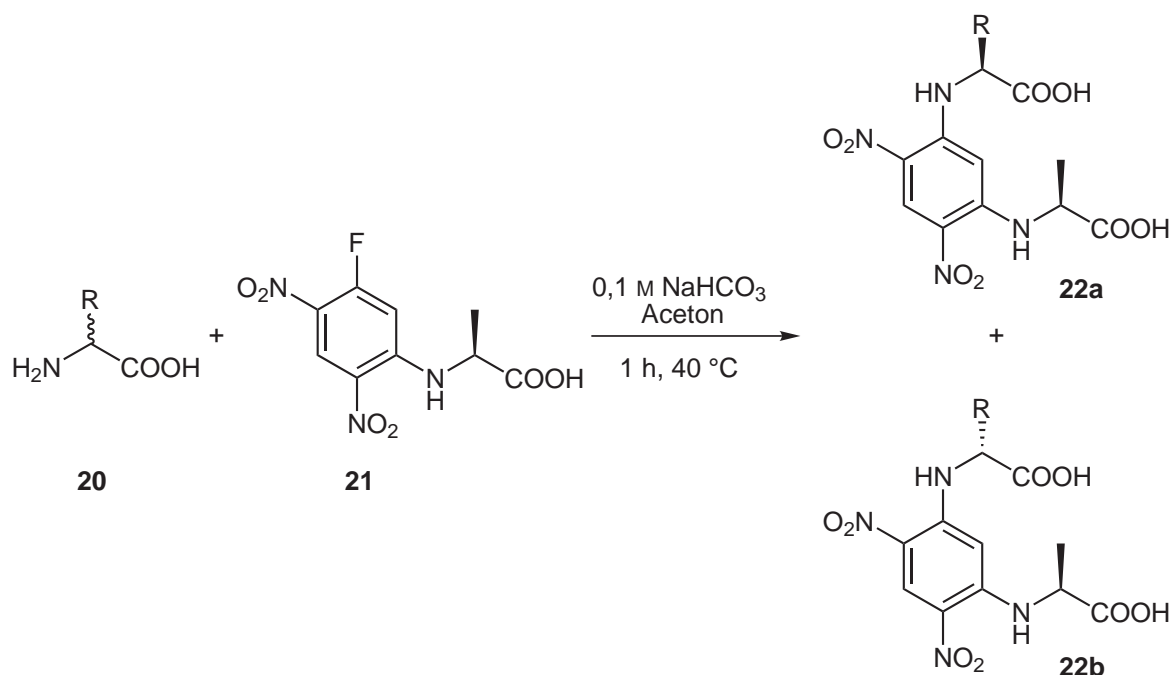


Abb. 29: Überführung eines Enantiomers in ein Diastereomer durch Marfey's Reagenz.^[109] Die beiden Diastereomere können z. B. auf einer RP-HPLC Säule getrennt werden.

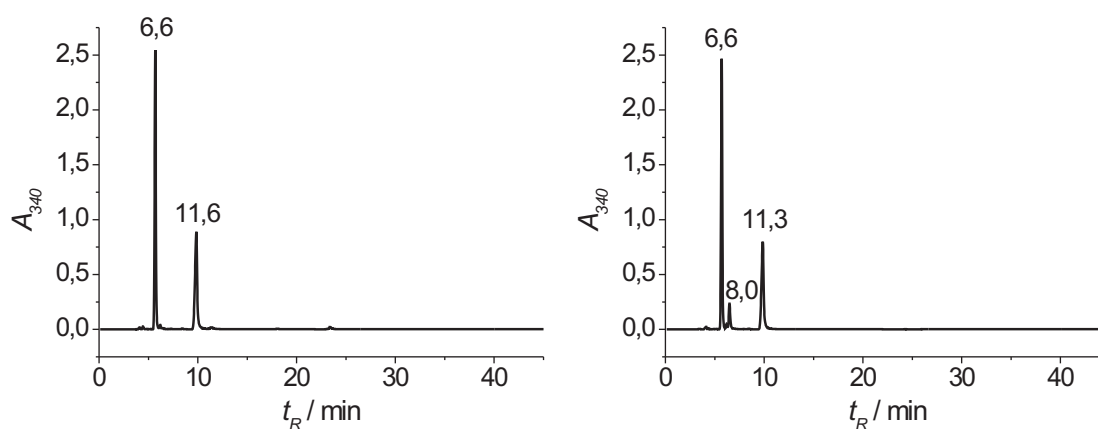


Abb. 30: RP-HPLC-Chromatogramme (aHPLC4) der mit Marfey's Reagenz derivatisierten Azidoalanine (**12**), wobei links die chemisch und rechts die enzymatisch synthetisierte Aminosäure dargestellt ist. Das Signal bei t_R = 6,6 min kann **21** zugeordnet werden. Die Signale bei t_R = 11,6 bzw. 11,3 min werden dem jeweiligen L,L-Diastereomer zugeordnet, das Signal bei t_R = 8,0 min unverbrauchtem L-Serin.

len quantitativ das L-Enantiomer des Azidoalanins dargestellt. Im Fall der enzymatischen Synthese tritt ein weiteres Signal bei t_R = 8,0 min auf. Dieses wird nicht verbrauchtem Serin – dem Edukt der Synthese, das durch Ionenaustauschchromatographie nicht von Aza getrennt werden kann – zugeschrieben. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass

auf chemischem und enzymatischem Syntheseweg die gleiche Substanz hergestellt wurde, wobei der Aufwand im Falle der enzymatischen Synthese wesentlich geringer, die Ausbeute aber bedeutend höher war.

2.2.4 Enzymatische Synthese von L-Azidohomoalanin

Nach der erfolgreichen enzymatischen Synthese von Aza (**12**) sollte nun getestet werden, ob sich auch Aha (**10**) auf diesem Wege herstellen lässt. Dazu musste aber zunächst L-Homoserin (**23**) in *O*-Acetyl-L-homoserin (**24**) überführt werden. NAGAI und FLAVIN entwickelten eine Methode, um ausschließlich die Hydroxygruppe am γ -Kohlenstoff-Atom der freien Aminosäure zu acetylieren (siehe Abb. 31).^[110]

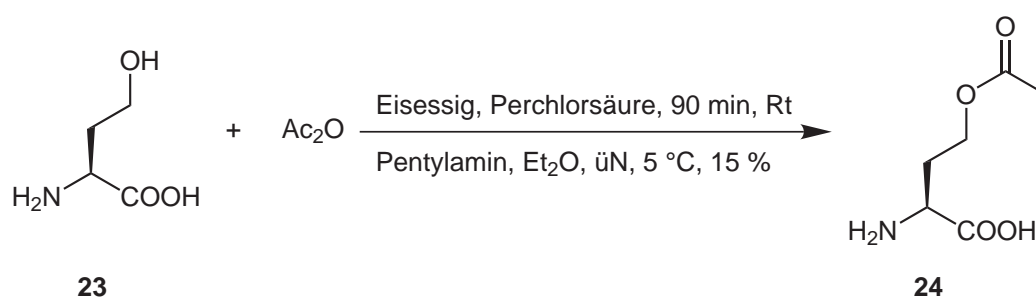


Abb. 31: Darstellung von *O*-Acetyl-L-homoserin.

Die Ausbeuten dieser Umsetzung waren allerdings sehr gering. Jedoch erübrigte sich eine Optimierung der Reaktion, da **24** nicht von rOASS-A umgesetzt wird (siehe Abb. 32). Es kann also das Nucleophil in dieser Reaktion variiert werden, das *O*-Acetyl-L-serin (**19**) selbst ist essentiell.

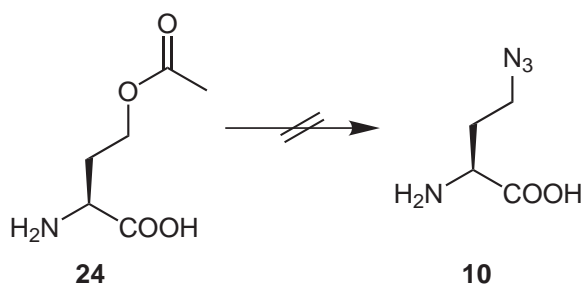


Abb. 32: Darstellung Aha auf enzymatischem Weg.

2.2.5 Chemische Synthese von L-Azidohomoalanin

Da im Fall von L-Azidohomoalanin (**10**) die enzymatische Synthese zu keinem Ergebnis führte, sollte **10** mit Methoden der klassischen organischen Chemie dargestellt werden.

Dazu wurde analog der Vorschrift von MANGOLD^[100] vorgegangen, wobei aber als Edukt (*S*)-(+)-2-Amino-4-brombuttersäure-hydrobromid (**25**) diente. Zunächst wurde die Säurefunktion in einen Methylester (**26**) umgewandelt und anschließend in einer S_N2 -Reaktion das Bromid am C^γ durch die Azidgruppe ersetzt (**27**). Im basischen Milieu erfolgte daraufhin die Verseifung des Esters zur freien Aminosäure **10** (siehe Abb. 33). Versuche einer Verseifung unter sauren Bedingungen – und die damit verbundene höhere Temperatur – führten zu einem hohen Anteil an reduziertem Aha, d. h. zu 2,4-Diaminobuttersäure.

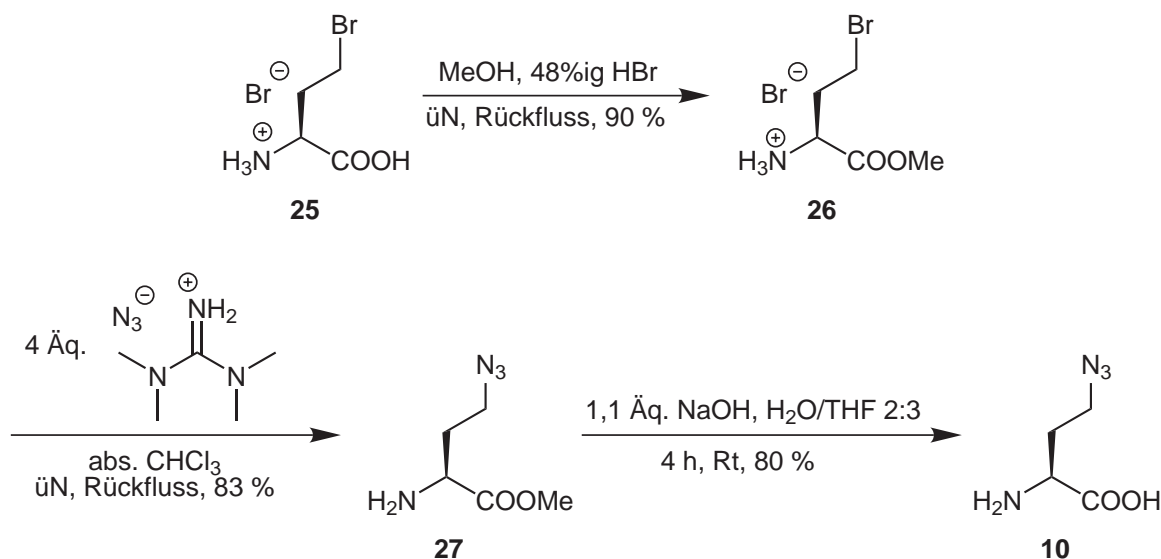


Abb. 33: Darstellung von Aha durch chemische Synthese.

Die Synthese lieferte eine gute Gesamtausbeute von ca. 50 % (bezogen auf **25**) und das dargestellte Aha wies bei den jeweiligen Synthesen einen ee-Wert von 90 – 98 % auf (Bestimmung siehe 2.2.3).

2.3 Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition mit Aha¹- und Hpg¹-Barstar

Im Folgenden sollten die Möglichkeiten einer posttranslationalen Modifizierung von Proteinen mittels Huisgen-Cycloaddition untersucht werden. Da sich auf Grund fehlender geeigneter Cyclooctinderivate die von BERTOZZI beschriebene Alternative einer katalysatorfreien Huisgen-Cycloaddition^[86] noch nicht durchsetzen konnte, sollte in dieser Arbeit nach erfolgreicher Methioninsubstitution die CCHC zum Einsatz kommen. In den beschriebenen Versuchen wurden als nicht-kanonische Methioninanaloga Aha (**10**) und Hpg (**11**) verwendet, da Aza sich als unbrauchbares Methioninanalogue erwies. Von Tirrell wurde zwar ein erfolgreicher Einbau in OmpC berichtet,^[111] doch konnte in keinem der im Arbeitskreis verwendeten Modellproteine Met signifikant durch Aza (**12**) ersetzt werden.

Als Modell sollte ein Protein fungieren, dessen Aminosäuresequenz nur ein Methionin – das N-terminale – aufweist. Außerdem sollte es am N-Terminus in zweiter Position eine Aminosäure mit großer Seitenkette enthalten, um eine (teilweise) N-terminale Prozessierung zu vermeiden (siehe 1.2.3). Beide Bedingungen sind bei Barstar gegeben. Seine dreidimensionale Struktur ist in Abb. 34 gezeigt.

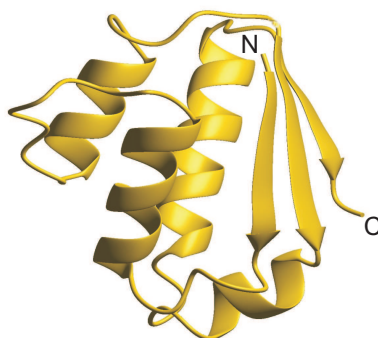


Abb. 34: Ribbondiagramm der dreidimensionalen Struktur von Barstar mit markiertem N- und C-Terminus.

Barstar ist der Inhibitor der Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens*; die Bindung erfolgt über Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen. Wird Barnase ohne Barstar exprimiert, ist dieses Enzym auf Grund der Ribonucleaseaktivität lethal. Das in dieser Arbeit benutzte rekombinante Protein besteht aus 90 Aminosäuren und ist cysteinfrei; es sind folgende Mutationen vorgenommen worden: Pro28Ala/Cys41Ala/Cys83Ala. Diese Mutante, die auch häufig für Faltungsstudien benutzt wird,^[112] wurde ψ -b* genannt und weist an N-terminaler Position 2 und 3 jeweils Lysin auf.

2.3.1 Expression und Reinigung der Barstarvarianten

Barstar wird in *E. coli*-Zellen in Form von Inclusion Bodies überexprimiert, was die Gefahr einer möglichen Reduktion minimieren sollte. Das Protein faltet jedoch leicht zurück und kann durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt werden. Daher ist es nicht nötig, das Protein mit einem zusätzlichen 6×His-Tag zu fusionieren.

Der Einbau der nicht-natürlichen Aminosäuren Aha (**10**) und Hpg (**11**) erfolgte nach dem Protokoll der SPI-Methode (siehe 1.4 und 4). Bei der Expression der beiden Varianten wurden jeweils ungefähr 50 % der Ausbeute des Met-Proteins erhalten (ψ -b*: 10 mg L⁻¹, Aha- ψ -b*: 5 mg L⁻¹, Hpg- ψ -b*: 5,5 mg L⁻¹). Da Aha (**10**) nur 5 Da leichter ist als Met (**1**), ist es selbst in einem hochaufgelösten Massenspektrum schwierig, den Erfolg des Einbaus zu quantifizieren, da sich die Isotopenmuster überlagern. Daher wurde das

theoretische Isotopenmuster für Aha- ψ -b* berechnet und mit dem gemessenen Spektrum verglichen (siehe Abb. 35, links). Wie klar zu erkennen ist, sind beide Spektren nahezu deckungsgleich. Daher kann von einem Aha-Einbau über 95 % ausgegangen werden. Die Reduktion von Aha (**10**) zu 2,4-Diaminobuttersäure ist erwartungsgemäß nicht beobachtet worden. Der Unterschied zwischen Met (**1**) und Hpg (**11**) ist mit 22 Da groß genug, um massenspektrometrisch zwischen den beiden ψ -b*-Varianten unterscheiden zu können (siehe Abb. 35, rechts). Hier wurden in 90 – 95 % des Proteins Hpg (**11**) anstelle von Met (**1**) eingebaut.

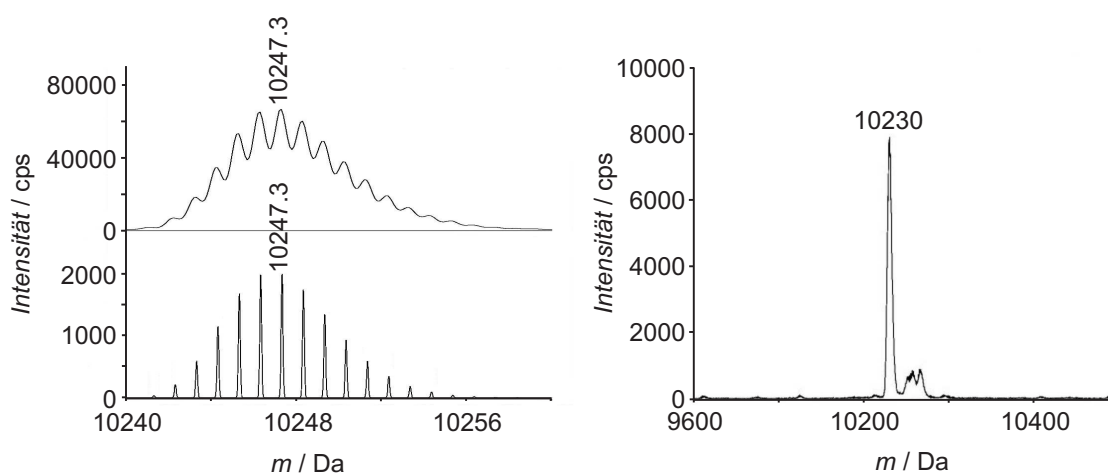


Abb. 35: Links: Nach Dekonvolution erhaltenes ESI-MS-Spektrum von gereinigtem Aha- ψ -b* (oben) und die theoretische Massenverteilung (unten). Das nahezu identische Muster lässt auf einen fast quantitativen Met→Aha-Austausch schließen. Rechts: Nach Dekonvolution erhaltenes ESI-MS-Spektrum von Hpg- ψ -b*. Hier beträgt der Einbau ca. 90 – 95 %.

Da beide Varianten (Aha- ψ -b* und Hpg- ψ -b*) in guten Ausbeuten und mit einem hohen Substitutionsgrad exprimiert werden konnten, sollte im Folgenden an diesen Modellproteinen die Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition untersucht werden. Dazu sollten in einem ersten Schritt zunächst Fluoreszenzfarbstoffe mit den Proteinen verknüpft werden, da dies eine einfach zu detektierende Modifizierung darstellt. So kann nach der SDS-PAGE das Gel unter UV-Licht betrachtet werden. Im Falle einer erfolgreichen Reaktion ist eine fluoreszierende Bande zu sehen. Im nächsten Schritt sollten dann verschiedene Derivate von Kohlenhydraten mit den Proteinen verknüpft und untersucht werden.

2.3.2 Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition der Barstarvarianten mit Fluoreszenzfarbstoffen

2.3.2.1 Synthese geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe

Für die zu synthetisierenden Farbstoffe wurde jeweils das Fluorescein-Grundgerüst als Ausgangspunkt gewählt. Zur Einführung der Alkinfunktion wurde ein Tripeptid der Struktur

Fmoc-Pra-Leu-Lys-OH (**30**) synthetisiert und die freie Aminogruppe des Lysins mit 5-Carboxyfluorescein-*N*-succinimidylester (**31**) zur Reaktion gebracht (siehe Abb. 36). Alle Zwischenstufen konnten in guter Ausbeute erhalten werden. Versuche zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus des Peptids führten zu keinem positiven Ergebnis. Ein Grund dafür mag die kleine Ansatzgröße (max. 21 μ mol) sein, die eine Trennung und Aufreinigung des Reaktionsgemisches erschwert. Dennoch war es möglich, eine methanolische Lösung von **32** in wässrigen Systemen zur Reaktion zu bringen (siehe 2.3.2).

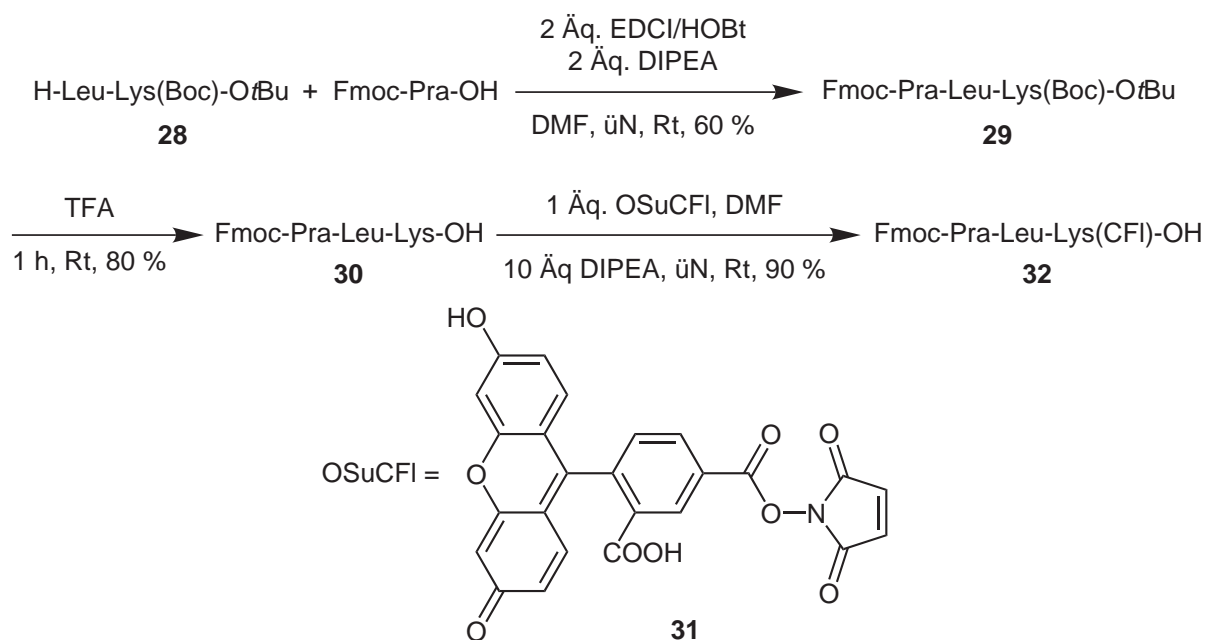


Abb. 36: Darstellung eines Farbstoffpeptids mit Alkinfunktionalität.

Die Synthese eines azidhaltigen Fluoresceinderivats **34** erfolgte analog der Vorschrift zur Darstellung von 7-Azido-4-methylcoumarin von CHEN *et al.*^[113] In Abb. 37 ist der Syntheseweg dargestellt. Die Reaktion verläuft in guten Ausbeuten, und das in Methanol gelöste **34** kann ebenfalls in wässrigen Systemen unter CCHC-Bedingungen reagieren.

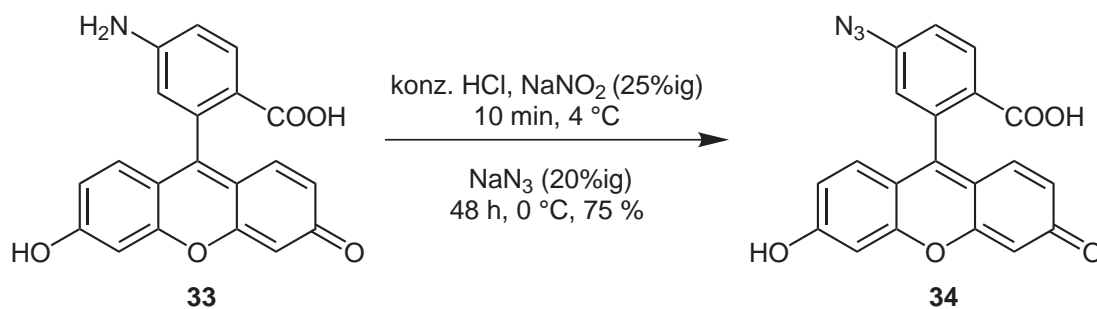


Abb. 37: Darstellung eines azidhaltigen Fluoreszenzfarbstoffs.

2.3.2.2 Konjugation der Barstarvarianten mit den Fluoreszenzfarbstoffen

Zunächst sollte Hpg- ψ -b* mit **34** zur Reaktion gebracht werden. Dazu wurde die Tris-gepufferte Proteinlösung mit dem in Methanol gelösten Farbstoff zusammengegeben und mit einer vorher hergestellten Lösung aus L-Ascorbinsäure und Kupfer(II)-sulfat versetzt. Da in vorangegangenen Experimenten beobachtet wurde, dass durch Zugabe der L-Ascorbinsäure zur Reaktionslösung der pH-Wert auf 3 gesenkt wurde, wurde zusätzlicher Puffer zugesetzt (Details siehe 4). Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt oder alternativ 46 h bei 4 °C. In Abb. 38 sind sowohl die Struktur des Reaktionsproduktes als auch das entsprechende ESI-MS-Spektrum sowie ein Gel nach SDS-PAGE gezeigt. Das Gel zeigt eine deutliche Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht. Aus dem ESI-MS-Spektrum kann geschlossen werden, dass ca. 85 % des Hpg- ψ -b* mit **34** reagiert haben ($m_{ber} = 10603$ Da). Im Verlauf der massenspektrometrischen Analyse wurde das Reaktionsprodukt allerdings teilweise decarboxyliert ($m_{ber} = 10559$ Da). Das gewünschte Reaktionsprodukt konnte allerdings nie in quantitativen Ausbeuten erhalten werden, so dass das hier gezeigte Spektrum das bestmögliche Ergebnis darstellt.

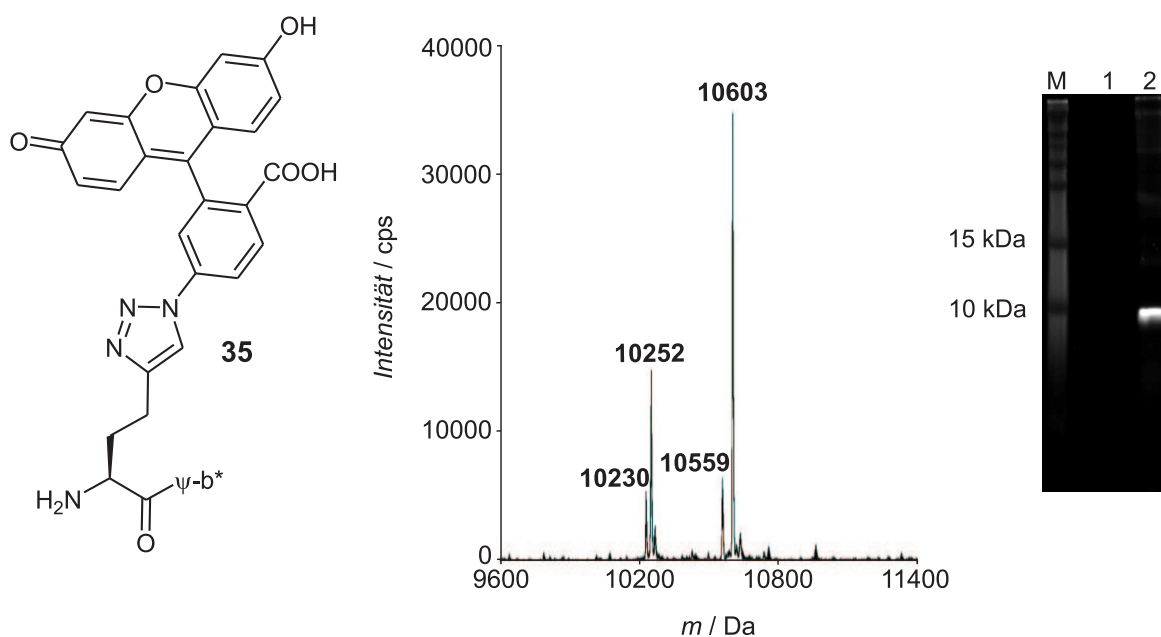


Abb. 38: Links: Strukturformel des Reaktionsproduktes (**35**) von Hpg- ψ -b* mit **34**. Mitte: Nach Dekonvolution erhaltenes ESI-MS-Spektrum von **35** ($m_{ber} = 10603$ Da). Die zusätzlichen Signale lassen sich Hpg- ψ -b* ($m_{ber} = 10230$ Da), ψ -b* ($m_{ber} = 10252$ Da) und dem während der Analyse decarboxylierten Reaktionsprodukt ($m_{ber} = 10559$ Da) zuordnen. Rechts: 20%iges Gel nach SDS-PAGE und Anregung mit UV-Licht (M: Molekulargewichtsstandard, 1: Hpg- ψ -b*, 2: **35**).

Nachfolgend sollte überprüft werden, ob sich Aha- ψ -b* mit **32** umsetzen lässt. Die ge-

wählten Reaktionsbedingungen waren identisch mit denen für die Reaktion von Hpg- ψ -b* mit **34**. Überraschenderweise konnte reproduzierbar eine nahezu quantitative Konjugation von Aha- ψ -b* mit dem Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden ($m_{ber} = 11182$ Da). Die Struktur des Reaktionsproduktes sowie das korrespondierende ESI-MS-Spektrum und ein 20%iges Gel nach UV-Anregung sowie Coomassiefärbung sind in Abb. 39 gezeigt.

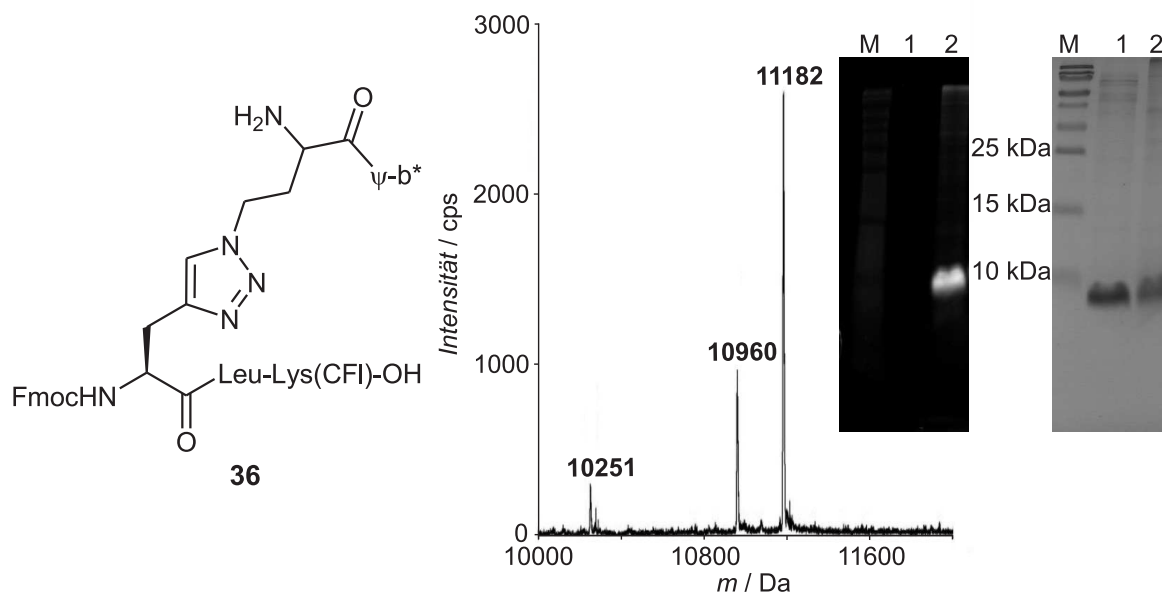


Abb. 39: Links: Strukturformel des Reaktionsproduktes (**36**) von Aha- ψ -b* mit **32**. Mitte: Nach Dekonvolution erhaltenes ESI-MS-Spektrum von **36** ($m_{ber} = 11182$ Da). Die zusätzlichen Signale lassen sich ψ -b* ($m_{ber} = 10252$ Da) und dem Reaktionsprodukt, von dem während der Analyse Fmoc abgespalten wurde, zuordnen ($m_{ber} = 10960$ Da). Rechts: 20%iges Gel nach SDS-PAGE und Anregung mit UV-Licht sowie nach Färbung mit Coomassie (M: Molekulargewichtsstandard, 1: ψ -b*, 2: **36**).

Das im ESI-MS-Spektrum auftretende Signal bei $M = 10960$ Da entspricht dem Fmoc-entschützten Reaktionsprodukt (**36**). Die Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe während der massenspektrometrischen Analyse wurde auch schon bei den Analysen während der Peptidsynthese beobachtet und wird somit nicht durch die Reaktionsbedingungen hervorgerufen. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass sich mehr als 95 % Aha- ψ -b* umgesetzt haben, da außer den bereits erwähnten Signalen nur das zu ψ -b* gehörende Signal detektiert wird. Da sich die Isotopenmuster von Aha- ψ -b* und ψ -b* aber teilweise überlagern, kann ein geringer Anteil an nichtreagiertem Protein nicht ausgeschlossen werden.

Die reproduzierbar relativ hohe Ausbeute an konjugiertem Protein (**36**) im Vergleich zur konjugierten Hpg- ψ -b*-Variante (**35**) ist bemerkenswert. Es kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, ob es an den unterschiedlichen Strukturen der Farbstoffe liegt. Im Fall von

34 ist die Azidogruppe Substituent eines Phenylrings. Die Alkingruppe in **32** hingegen ist wesentlich flexibler, da sie sich in der Seitenkette einer Aminosäure befindet. Durch diese höhere Flexibilität kann eventuell der für die Reaktion nötige Übergangszustand leichter erreicht werden. Gestützt wird diese Annahme, dass eine flexible Alkin-/Azido-Gruppe sich positiv auf die Ausbeute auswirkt, durch Ergebnisse mit weiteren Reaktionspartnern, die an dieser Stelle aber nicht aufgeführt werden. Aus 2.1.2 und der Literatur sind aber auch gegenläufige Beispiele bekannt.^[92]

2.3.3 Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition von Aha- ψ -b* mit alkinfunktionalisierten Kohlenhydraten

Die durch die Konjugation der ψ -b*-Varianten mit Fluoreszenzfarbstoffen erhaltenen Kenntnisse sollten genutzt werden, um zu überprüfen, ob die Proteinvarianten sich auch mit Kohlenhydraten durch CCHC verknüpfen lassen. Dadurch würde das Protein zu seiner Barnaseinhibition eine weitere Eigenschaft erhalten – nämlich die Fähigkeit, z. B. Lectine zu binden. Als Modellprotein diente für die nachfolgenden Experimente ausschließlich Aha- ψ -b*. Für die erfolgreiche Triazolbildung sollten die Kohlenhydrate die Alkinfunktion nicht direkt am Ring tragen, also nicht die OH-Gruppe am C¹ substituieren, da die Befürchtung bestand, dass die damit verbundene eingeschränkte Flexibilität zu einer Verminderung der Ausbeute führen würde. Daher wurden *N*-Acetylglucosamin (**37**) und *N,N'*-Diacetylchitobiose (**38**) verwendet, bei denen die Alkinfunktion über eine Etherbindung mit dem Sauerstoff am C¹ des Kohlenhydrats verbunden ist.^a Die Bedeutung der beiden ausgewählten Kohlenhydrate liegt einerseits darin, dass *N,N'*-Diacetylchitobiose als Disaccharid den Beginn der Rumpfstruktur gewöhnlicher *N*-Glycoproteine darstellt. Andererseits ist die *O*-GlcNAc-Modifizierung eine der häufigsten posttranslationalen Modifizierungen von Zellkern- und Cytoplasmaproteinen, die ihrerseits in verschiedenen Zellregulationsprozessen eine wichtige Rolle spielen.^[114] In Abb. 40 ist das Reaktionsschema dargestellt; die jeweiligen Reaktionsprodukte werden Aha(GlcNAc)- ψ -b* bzw. Aha(ChiAc₂)- ψ -b* genannt.

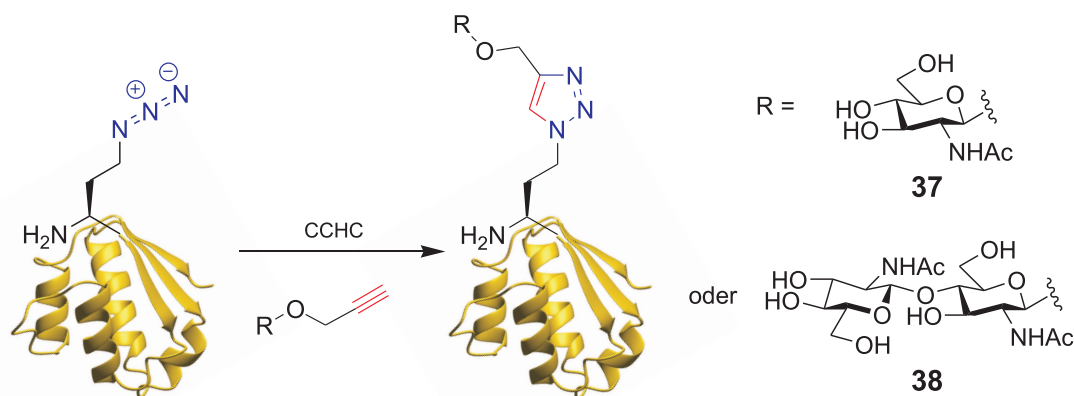


Abb. 40: Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition (CCHC) von Aha- ψ -b* mit alkinfunktionalisiertem *N*-Acetylglucosamin (**37**) und alkinfunktionalisierter *N,N'*-Diacetylchitobiose (**38**).

Aha- ψ -b* und das jeweilige Kohlenhydrat wurden in einer ausreichend Tris-gepufferten

^aDie verwendeten Kohlenhydrate wurden großzügigerweise von Prof. Dr. Valentin Wittmann, Konstanz, zur Verfügung gestellt.

Lösung mit einer zuvor hergestellten Mischung aus Kupfer(II)-sulfat und L-Ascorbinsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 46 h bei 4 °C geschüttelt und anschließend dreimal gegen PBS dialysiert. In Abb. 41 ist ein mit Coomassie gefärbtes Gel nach erfolgter Reaktion und Dialyse gezeigt.

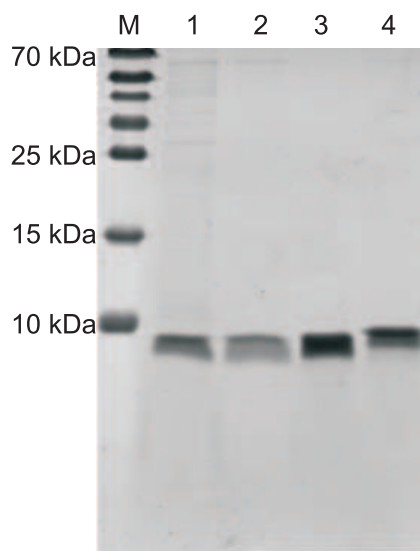


Abb. 41: Coomassie gefärbtes 20%iges Gel nach SDS-PAGE. M: Molekulargewichtsstandard; 1: ψ -b*, 2: Aha- ψ -b*, 3: Aha(GlcNAc)- ψ -b*, 4: Aha(ChiAc₂)- ψ -b*.

In allen vier Spuren tritt die für Barstar typische breite Bande unterhalb der entsprechenden Markerbande (10 kDa) auf. Darüber hinaus sind keine weiteren Banden erkennbar. Während ψ -b* und Aha- ψ -b* erwartungsgemäß Banden auf der gleichen Höhe ergeben, wird für Aha(GlcNAc)- ψ -b* und Aha(ChiAc₂)- ψ -b* jeweils ein Shift in der Migrationsweite deutlich. Dieser Shift ist für das Barstarkonjugat mit dem *N,N'*-Diacetylchitobiosederivat – einem Disaccharid – ausgeprägter als für das mit dem *N*-Acetylglucosamin – einem Monosaccharid – konjugierte Protein. Dadurch war ein erster Hinweis auf einen erfolgreichen Umsatz gegeben. In der anschließend durchgeführten LC-ESI-MS-Analyse wurde die Vermutung einer hohen Reaktionsausbeute bestätigt.

In den gezeigten Spektren (siehe Abb. 42) sind ausschließlich Signale detektierbar, die den Reaktionsprodukten Aha(GlcNAc)- ψ -b* ($m_{ber} = 10507$ Da) und Aha(ChiAc₂)- ψ -b* ($m_{ber} = 10710$ Da) sowie der Met-Variante ($m_{ber} = 10252$ Da), die nicht reagieren kann, entsprechen. Da sich die Isotopenmuster der Met-Variante und Aha- ψ -b* überlagern, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass noch ca. 1 – 2 % der unmodifizierten Aha-Variante vorliegen. Trotzdem kann von einem nahezu quantitativen Umsatz gesprochen werden.

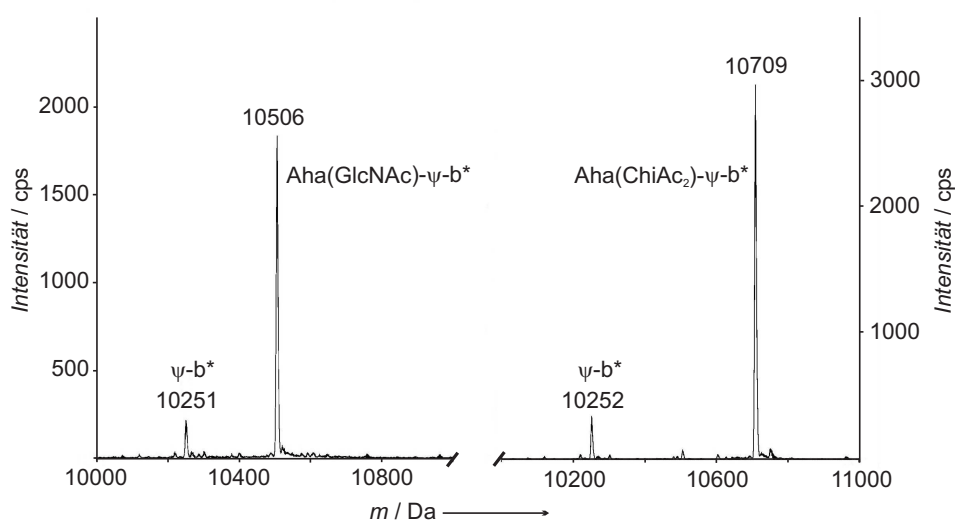


Abb. 42: Nach Dekonvolution erhaltene ESI-MS-Spektren von Aha(GlcNAc)- ψ -b* (links, $m_{ber} = 10507$ Da) und Aha(ChiAc₂)- ψ -b* (rechts, $m_{ber} = 10710$ Da). Das in beiden Spektren jeweils zusätzlich auftretende Signal wird ψ -b* zugeordnet ($m_{ber} = 10252$ Da).

2.3.3.1 Barnaseinhibition durch Aha- ψ -b* und seine Glycokonjugate

Nach der erfolgreichen Met \rightarrow Aha-Substitution und anschließender Konjugation mit zwei verschiedenen Kohlenhydraten sollte überprüft werden, ob die genannten Veränderungen eine Auswirkung auf die natürliche Funktion von Barstar – die Inhibition der Ribonuclease Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* – haben. Dazu wurde der von HARTLEY beschriebene Assay verwendet.^[115] Als Barnasesubstrat dient hierbei folgende kurze, C- und N-terminal fluoreszenzgelabelte Nucleotidsequenz: Fluorescein-dArGdAdA-TAMRA. Durch die Spaltung mittels Barnase^b nach rG ist das FRET-System Fluorescein-TAMRA gestört und es kann nach einer Anregung durch Licht mit einer Wellenlänge von 489 nm nicht mehr ein Emissionsmaximum bei 577 nm (TAMRA), sondern bei 519 nm (Fluorescein) detektiert werden. Somit kann durch die Verfolgung des Fluoreszenzsignals bei 519 nm über die Zeit festgestellt werden, ob die Sequenz von Barnase gespalten wird oder nicht. In Abb. 43 sind die Ergebnisse für verschiedene Konzentrationen von ψ -b*, Aha- ψ -b*, Aha(GlcNAc)- ψ -b* und Aha(ChiAc₂)- ψ -b* nach jeweils 40 Sekunden Reaktionszeit gezeigt.

Wie eindeutig zu erkennen ist, liegt die zur Inhibition nötige Barstarkonzentration in allen Fällen in der gleichen Größenordnung. Eine erwähnenswerte Ausnahme macht allerdings Aha(ChiAc₂)- ψ -b*. Die verhältnismäßig große Abweichung kann aber durch eventuelle Aggregatbildung erklärt werden, die zu einem falschen Ergebnis in der Konzentrationsbestimmung führen kann. Da aber kein dramatischer Verlust der Inhibitionsfähigkeit zu erkennen ist – sondern eher das Gegenteil –, kann davon ausgegangen werden, dass die Änderungen am N-Terminus keinen negativen Einfluss auf die Funktion des Barstars als

^bDie verwendete Barnase wurde von Dr. Ralph Golbik, Halle, zur Verfügung gestellt.

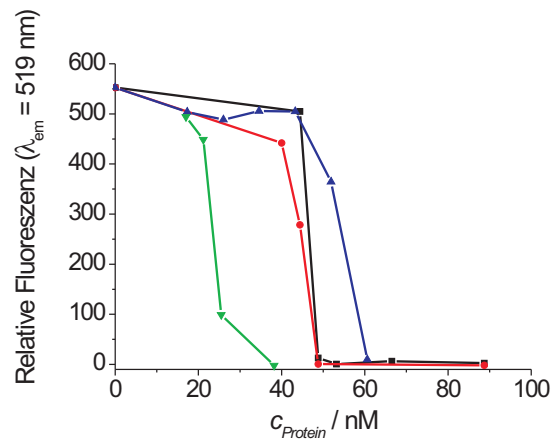


Abb. 43: Aktivitätsassay für Barnase nach HARTLEY,^[115] wobei die Barnasekonzentration jeweils 41 nM betrug und die Messung nach 40 Sekunden beendet wurde. Eine relative Fluoreszenz von 0 zeigt eine erfolgreiche Inhibition von Barnase an. Durchgeführt wurde der Assay mit verschiedenen Konzentrationen von $\psi\text{-b}^*$ (schwarz), Aha- $\psi\text{-b}^*$ (rot), Aha(GlcNAc)- $\psi\text{-b}^*$ (blau) und Aha(ChiAc₂)- $\psi\text{-b}^*$ (grün).

Barnaseinhibitor hat.

2.3.3.2 SPR-Experimente mit Aha- $\psi\text{-b}^*$ und seinen Glykokonjugaten

Da bekannt ist, dass die beiden gewählten Kohlenhydrate **37** und **38** an WGA (wheat germ agglutinin) binden, sollte überprüft werden, ob dies auch für die durch die CCHC hergestellten Glykokonjugate gilt. WGA ist ein Lectin, das üblicherweise dazu genutzt wird, die natürliche posttranslationale Modifizierung mit *O*-GlcNAc zu detektieren. Um zu überprüfen, ob dies auch für die Glykokonjugate von Aha- $\psi\text{-b}^*$ gilt, wurden SPR-Experimente (SPR: surface plasmon resonance) durchgeführt. Dazu wurden Aha- $\psi\text{-b}^*$, Aha(GlcNAc)- $\psi\text{-b}^*$ sowie Aha(ChiAc₂)- $\psi\text{-b}^*$ auf einem SM5-Chip mittels Carbodiimid und *N*-Hydrosuccinimid immobilisiert. Die Bindung von WGA an die Proteinvarianten in Abhängigkeit von der WGA-Konzentration ist in Abb. 44 für den stationären Zustand gezeigt.

Während Aha- $\psi\text{-b}^*$ erwartungsgemäß keinen Bindungspartner für WGA darstellt, zeigen Aha(GlcNAc)- $\psi\text{-b}^*$ und Aha(ChiAc₂)- $\psi\text{-b}^*$ eine hohe Affinität dem Lectin gegenüber. Die aus den Kurvenverläufen berechneten Gleichgewichtskonstanten ergeben mit dem Modell der „steady-state“-Bindung für Aha(ChiAc₂)- $\psi\text{-b}^*$ einen etwa achtfach kleineren Wert als für Aha(GlcNAc)- $\psi\text{-b}^*$ ($K_d = 64 \pm 6$ nM für Aha(ChiAc₂)- $\psi\text{-b}^*$ zu $K_d = 517 \pm 78$ nM für Aha(GlcNAc)- $\psi\text{-b}^*$). Aha(GlcNAc)- $\psi\text{-b}^*$ hat somit eine höhere Affinität zu WGA als Aha(ChiAc₂)- $\psi\text{-b}^*$. Die hier erzielten Ergebnisse haben in etwa die gleiche Größenordnung wie die von immobilisierten GlcNAc-Derivaten unter vergleichbaren Bedingungen.^[116]

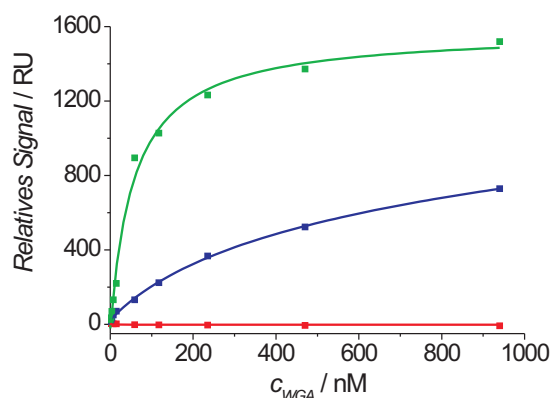


Abb. 44: SPR-Assay mit immobilisierten Barstarvarianten (rot: Aha- ψ -b*, blau: Aha(GlcNAc)- ψ -b* und grün: Aha(ChiAc₂)- ψ -b*) in Abhängigkeit der WGA-Konzentration.

Durch die beschriebene Konjugation konnte also für ψ -b* eine zusätzliche Eigenschaft (Lectinbindung) zur eigentlichen Funktion (Ribonucleaseinhibition) generiert werden.

2.3.3.3 Biophysikalische Charakterisierung der Glykokonjugate von Aha- ψ -b*

Abschließend sollte untersucht werden, inwieweit sich sowohl die Met→Aha-Substitution als auch die anschließende Glykokonjugation auf die strukturelle Integrität von ψ -b* auswirken. Dazu sollte das Verhalten der Proteine gegenüber circular polarisiertem Licht (CD-Spektroskopie) analysiert sowie Schmelzkurven aufgenommen werden. Darüber hinaus sollte getestet werden, ob die Veränderungen am N-Terminus eine Auswirkung auf die Fluoreszenzeigenschaften haben. Denn mit Hilfe der CD-Spektroskopie können Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur und durch Fluoreszenzspektroskopie auf die Tertiärstruktur eines Proteins gezogen werden.

In Abb. 45 sind die CD-Spektren für ψ -b* (schwarz) sowie die Aha-Variante (rot) und die beiden Glykokonjugate gezeigt (blau und grün). Die Spektren für ψ -b* und Aha- ψ -b* sind fast identisch, d. h., die dreidimensionale Struktur des Proteins hat sich durch die Substitution mit Aha nicht geändert. Für die mit den Kohlenhydraten konjugierten Proteinvarianten erreicht das Minimum bei 220 nm allerdings jeweils einen geringfügig kleineren Wert als für die nichtkonjugierten Varianten. Dies lässt auf eine etwas mehr geordnete Gesamtstruktur nach der Konjugation schließen. Außerdem ist für Aha(GlcNAc)- ψ -b* (blau) das Minimum bei 208 nm wesentlich ausgeprägter als bei den anderen Varianten.

Betrachtet man die thermische Denaturierung (siehe Abb. 46), so fällt auf, dass die Kurve für ψ -b* den flachsten Anstieg aufweist. Diese Proteinvariante hat mit ca. 68 °C auch die höchste Schmelztemperatur. Die Aha- ψ -b*-Variante und ihre Glycoderivate wei-

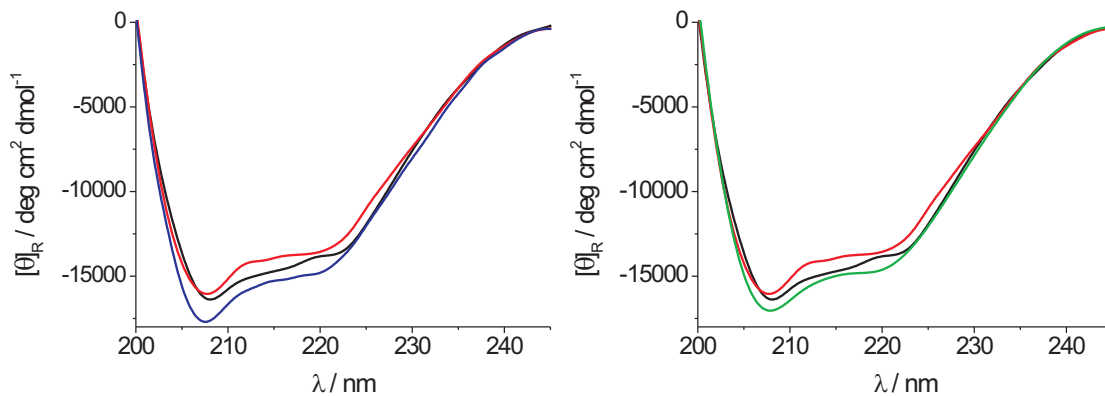


Abb. 45: CD-Spektren der Barstarvarianten ψ -b* (schwarz), Aha- ψ -b* (rot), Aha(GlcNAc)- ψ -b* (blau) und Aha(ChiAc₂)- ψ -b* (grün).

sen hingegen einen 2 – 4 °C niedrigeren Schmelzpunkt auf und besitzen eine niedrigere van't-Hoff-Enthalpie (bis zu ca. 20 % für Aha- ψ -b*, siehe Tab. 5). Letzteres spricht für eine höhere Kooperativität des Entfaltungsprozesses für die Aha-haltigen Proteine. Dass der Austausch von Met mit nicht-kanonischen Aminosäuren zu einer relativ großen Veränderung der van't-Hoff-Enthalpiewerte bei gleichzeitig nahezu gleichbleibender Schmelztemperatur führen kann, ist in der Literatur bereits bekannt.^[117]

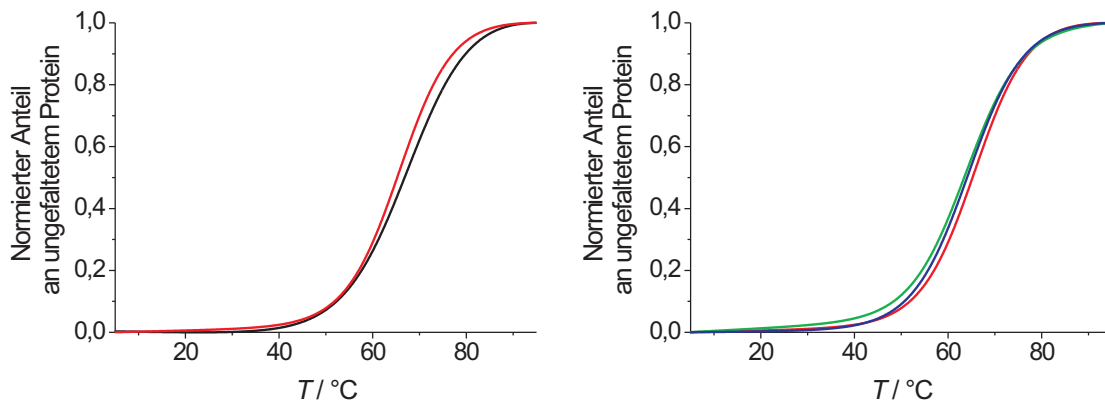


Abb. 46: Schmelzkurven der Barstarvarianten ψ -b* (schwarz), Aha- ψ -b* (rot), Aha(GlcNAc)- ψ -b* (blau) und Aha(ChiAc₂)- ψ -b* (grün).

Die durch CD-Spektroskopie gemachten Beobachtungen (geordnetere Struktur der Glykokonjugate) konnte mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie bestätigt werden. Hier wurde das Emissionsmaximum nach der Substitution von Met→Aha und anschließender Konjugation um 12 nm blauverschoben (siehe Abb. 47 und Tab. 5). Dieses Ergebnis stützt die

These, dass die Veränderung am N-Terminus einen Einfluss auf die Stabilität der dreidimensionalen Struktur des Proteins hat.

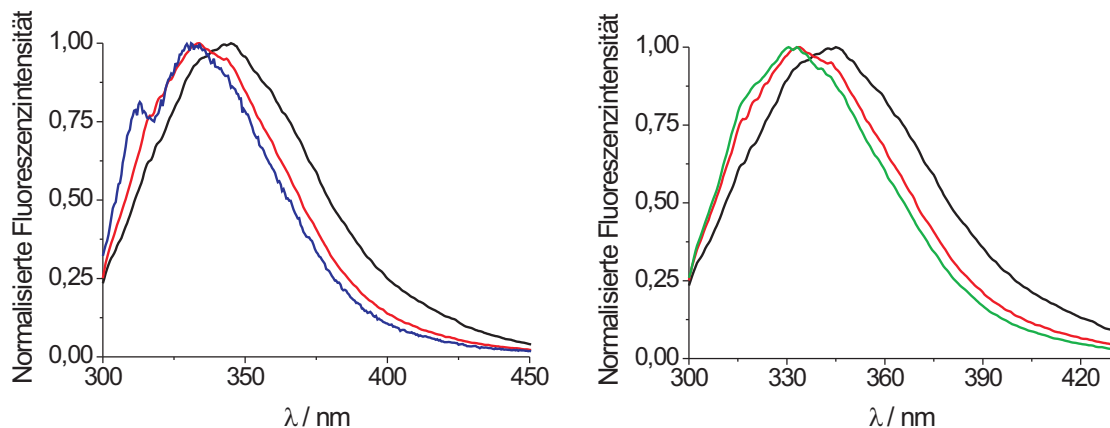


Abb. 47: Fluoreszenzspektren der Barstarvarianten ψ -b* (schwarz), Aha- ψ -b* (rot), Aha(GlcNAc)- ψ -b* (blau) und Aha(ChiAc₂)- ψ -b* (grün).

In Tab. 5 sind noch einmal alle Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen zusammengefasst.

Tab. 5: Ergebnisse der massenspektrometrischen und biophysikalischen Untersuchungen von ψ -b*, Aha- ψ -b* und der Glycokonjugate Aha(GlcNAc)- ψ -b* sowie Aha(ChiAc₂)- ψ -b*.

Protein	T_m / °C	ΔH / J mol ⁻¹	λ_{max} / nm	$m_{ber.}$ / Da	$m_{gef.}$ / Da
ψ -b*	67,89 ± 0,18	-139330 ± 4116	345	10252	10252
Aha- ψ -b*	65,87 ± 0,03	-165579 ± 1218	333	10247	10247
Aha(GlcNAc)- ψ -b*	64,17 ± 0,05	-158703 ± 1688	333	10507	10506
Aha(ChiAc ₂)- ψ -b*	63,86 ± 0,03	-158154 ± 993	333	10710	10709

Durch die nahezu quantitative Substitution von Met gegen Aha in ψ -b* konnte eine funktionelle Proteinvariante generiert werden, die mittels Kupfer-katalysierter Huisgen-Cycloaddition (CCHC) u. a. mit Kohlenhydraten verknüpft werden konnte. Die jeweiligen Aha-Proteinvarianten zeichnen sich dabei durch eine geringfügig dichter gepackte Struktur bei gleichzeitig etwas geringerer Stabilität aus. Durch die Funktionalisierung erhielt ψ -b* mit der Fähigkeit der Lectinbindung eine zusätzliche Funktionalität.

2.4 Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition von hEGF mit einem azidfunktionalisiertem Kohlenhydrat

Für die weiteren Studien zur Kupfer-katalysierten Huisgen-Cycloaddition auf Proteinebene wurde als Modellprotein hEGF (human epidermal growth factor) gewählt. Das gereifte Protein wird durch proteolytische Spaltung erhalten und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums, der Zellteilung und der Zelldifferenzierung.^[118] Es zeichnet sich durch eine sehr hohe Affinität zum EGF-Rezeptor aus und stimuliert die spezifische Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität, die ihrerseits eine Signaltransduktionskaskade initiiert.^[119]

Für die Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition sollte im Folgenden Hpg- τ -hEGF mit einem Kohlenhydrat konjugiert werden. Die Herstellung einer Glycovariante von hEGF ist von großem Interesse, da dieses Protein, wie bereits erwähnt, eine Rolle im Zellwachstum spielt und somit auch mitverantwortlich für die schnelle Verbreitung von Krebs ist. Obwohl anomale Glycosylierungen in allen Krebsarten auftreten, ist bis jetzt ungeklärt, ob diese Glycosylierung Folge oder Ursache für die Krebserkrankung ist.^[120] Des Weiteren sind einige glycosylierte Wachstumsfaktoren – z. B. HB-EGF^[121], TGF- β 1^[122] und HGF^[123] – gefunden worden, doch die Rolle der Kohlenhydrate ist oft nicht bis ins letzte Detail geklärt. Daher ist eine einfache Methode, Proteine posttranslational mit definierten Kohlenhydratstrukturen zu konjugieren, wünschenswert, um weitergehende Experimente durchzuführen.

Um eine einfache Reinigung des Proteins zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit eine hEGF-Mutante verwendet, die einen in-frame-6 \times His-Tag sowie einige zusätzliche Aminosäuren aus dem Vektor pET15b enthält. Insgesamt verlängerte sich das Protein N-terminal um 21 Aminosäuren. Das entsprechende rekombinante Protein wurde τ -hEGF genannt. Durch die Mutation wurden auch zwei zusätzliche Methionine in die Sequenz eingebracht: Met¹ (zu Initiation der Proteinbiosynthese) und Met²¹. Das ursprünglich in Position 22 lokalisierte Methionin des Wildtypproteins befindet sich in τ -hEGF in Position 43. In Abb. 48 sind die dreidimensionale Struktur des Maus-Wildtypproteins (mEGF) und das Schema des in dieser Arbeit verwendeten Proteins gezeigt.

Zur Überexpression der τ -hEGF-Varianten wurden methioninauxotrophe *E. coli*-Zellen (B834(DE3)) mit dem Plasmid pET15b-hEGF transformiert und in Minimalmedium, das eine limitierte Konzentration an Methionin enthält, kultiviert. Nach dem vollständigen Verbrauch des zugesetzten Methionins durch die Zellen erfolgte die Zugabe von Met (**1**) als Kontrolle, Aha (**10**) oder Hpg (**11**) und die Expression wurde durch IPTG induziert. Unter den genannten Bedingungen wird τ -hEGF in Inclusion Bodies exprimiert. Nach erfolgreicher Rückfaltung und Reinigung durch Ni-NTA-Chromatographie der einzelnen Varianten (Details siehe 4) wurde die Proteinidentität durch massenspektrometrische Analysen be-

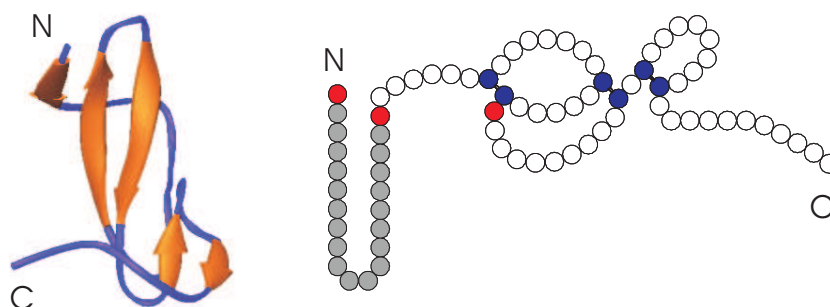


Abb. 48: Links: Ribbon-Diagramm der dreidimensionalen Struktur von mEGF.^[124] Rechts: Schema der in dieser Arbeit verwendeten humanen EGF-Mutante τ -hEGF mit gekennzeichneten Methioninresten (rot) und Cysteinen (blau) sowie den Disulfidbrücken. In beiden Strukturen sind der N- und der C-Terminus gekennzeichnet.

stätigt. In Abb. 49 sind die Spektren für die Met- bzw. Hpg-Varianten gezeigt.

Tab. 6: Auswertung der ESI-MS-Analysen der τ -hEGF-Varianten, wobei zur besseren Vergleichbarkeit das jeweils höchste Signal eines Spektrums einer Intensität von 100 % gleichgesetzt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass es sich hierbei jeweils um einen statistischen Einbau handelt. Im Fall von Aha wird die Azido-Gruppe teilweise reduziert; es resultiert dabei 2,4-Diaminobuttersäure (DAB).

Variante	m_{ber}/Da	m_{gef} / Da	Interpretation
τ -hEGF	8667	8667 (15 %) 8537 (100 %)	-Met ¹
Hpg- τ -hEGF	8601	8600 (100 %) 8492 (15 %) 8623 (40 %) 8645 (15 %) 8515 (10 %) 8536 (7 %)	3×Hpg 2×Hpg, -Hpg ¹ 2×Hpg, 1×Met 1×Hpg, 2×Met 1×Hpg, 1×Met, -Hpg ¹ 2×Met, -Met ¹
Aha- τ -hEGF	8652	8650 (33 %) 8525 (35 %) 8666 (55 %) 8535 (100 %) 8502 (40 %) 8571 (33 %) 8601 (30 %) 8713 (33 %)	3×Aha 2×Aha, -Aha ¹ 3×Met 2×Met, -Met ¹ 1×Met, 1×DAB, -Met ¹ 3×DAB 1×Met, 2×DAB nicht zugeordnet

Da mit Gly² in τ -hEGF eine kleine Aminosäure in Position 2 vorliegt, wird das N-terminale Met¹ durch *EcMetAP* abgespalten (siehe 1.2.3). Im Fall von Hpg- τ -hEGF ergibt

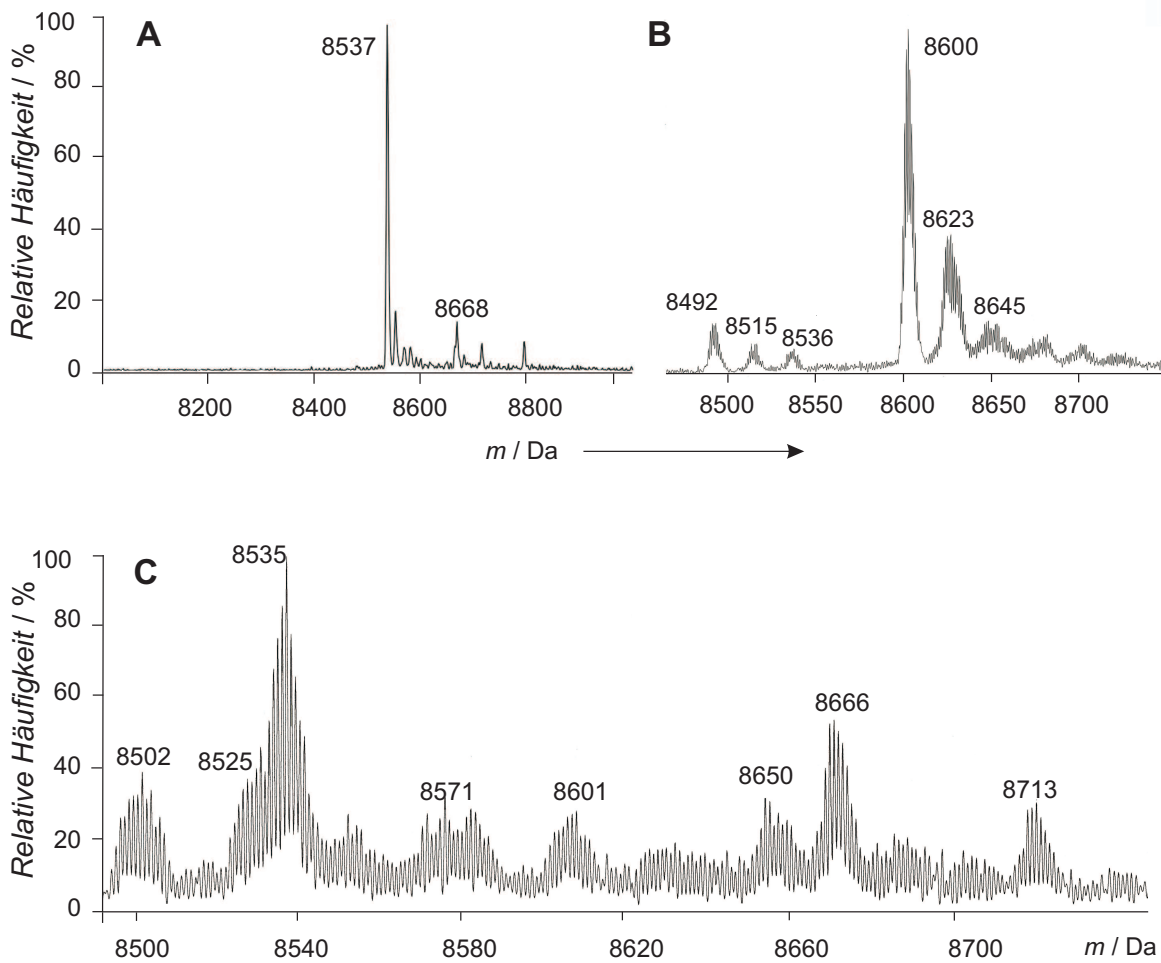


Abb. 49: Nach Dekonvolution erhaltene ESI-MS-Spektren für τ -hEGF (A, $m_{ber} = 8536$ Da), Hpg- τ -hEGF (B, $m_{ber} = 8601$ Da) und Aha- τ -hEGF (C, $m_{ber} = 8652$ Da). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das jeweils höchste Signal in jedem Spektrum einer Intensität von 100 % gleichgesetzt. Für die Zuordnung der zusätzlichen Signale siehe Tab. 6.

sich interessanterweise ein ganz anderes Bild. Die dominierende Spezies ist die Variante, in der alle drei Methionine durch Hpg substituiert worden sind und keine N-terminale Prozessierung erfolgt ist. Alle anderen Signale können Varianten zugeordnet werden, die entweder nur zwei oder ein Hpg eingebaut haben, bzw. einer N-terminal prozessierten Spezies (siehe Tab. 6). Der enorme Unterschied in der N-terminalen Prozessierung (95 % in der Met-Variante, 5 % in der Hpg-Variante) von nicht-kanonischen Aminosäuren wird im folgenden Kapitel (siehe 2.5.1) behandelt. Das Spektrum der Aha-Variante ist deutlich komplexer. Ursachen hierfür sind u. a. die wesentlich geringere Einbaueffizienz im Vergleich zur Hpg-Variante sowie die in 1.5 erwähnte Reduktion des Azidohomoalaninrestes zum 2,4-Diaminobuttersäurerest (DAB). Dass die Reduktion in diesem Fall so enorm ausfällt, ist überraschend, da das Protein genau wie ψ -b* in Inclusion Bodies exprimiert wird und daher das Risiko der Reduktion geringer sein sollte. Dennoch lässt sich folgende

Tendenz beobachten: Im Gegensatz zur Met-Variante halten sich N-terminal prozessierte und nicht-prozessierte Spezies ungefähr die Waage (siehe Tab. 6). Bei den N-terminal prozessierten Proteinvarianten kann weder im Fall von Hpg- τ -hEGF noch von Aha- τ -hEGF mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich bei der N-terminalen Aminosäure um Methionin handelt. Doch da in beiden Fällen auch Anteile (in der Hpg-Variante sogar der Hauptteil) von vollständig substituierten Proteinen gefunden worden ist, kann zumindest von einem statistischen Einbau am N-Terminus ausgegangen werden.

Für die CCHC wurde als Kohlenhydrat 1-Azido-1-deoxy- β -D-glucopyranosid (**14b**) gewählt. Zwar befindet sich die Azidogruppe direkt an C¹, doch sind die ersten Versuche mit diesem Kohlenhydrat und Peptiden vielversprechend verlaufen (siehe 2.1.2 und die Daten von JOSEPHSON *et al.*).^[125] Für die Glycokonjugation von Hpg- τ -hEGF wurde das Protein (2 mg mL⁻¹) mit dem Kohlenhydrat ($c_{final} = 1$ mM) und einer zuvor hergestellten Lösung aus Kupfer(II)-sulfat ($c_{final} = 1$ mM) und L-Ascorbinsäure ($c_{final} = 1$ mM) über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Ausbeute der Reaktion belief sich allerdings nur auf ca. 10 %. In Abb. 50 ist das abschließend aufgenommene ESI-MS-Spektrum gezeigt.

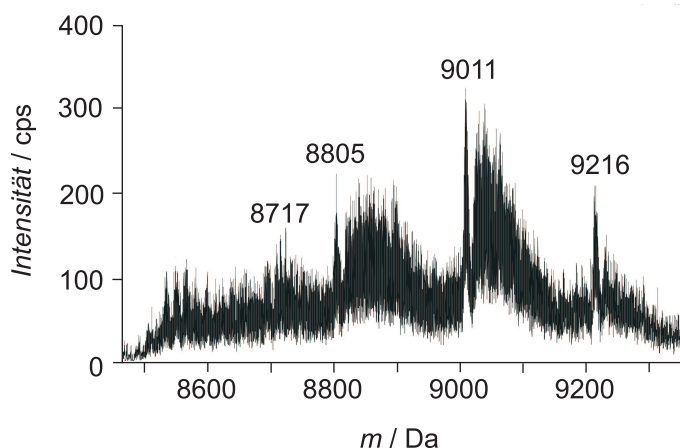


Abb. 50: Nach Dekonvolution erhaltenes ESI-MS-Spektrum des mit **14b** konjugierten Hpg- τ -hEGF ($m_{ber} = 9216$ Da).

Trotz des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses können einzelne Signale zugeordnet werden. So entsprechen die Signale von $M = 8805$ Da, $M = 9011$ Da und $M = 9216$ Da der Variante, die dreimal Methionin durch Hpg substituiert hat, mit jeweils einem, zwei oder drei konjugierten Kohlenhydratmolekülen ($M_{ber} = 8806$ Da, $M_{ber} = 9011$ Da und $M_{ber} = 9216$ Da). Das Signal bei $M = 8717$ Da kann der N-terminal prozessierten Variante mit einem Met und einem Hpg, das mit dem Kohlenhydrat verbunden ist, zugeordnet werden.

In der Literatur ist bekannt, dass bestimmte Proteine nach der Zugabe von L-Ascorbinsäure und Kupfer zur spontanen Präzipitation neigen.^{[126],[127]} Der geringe Anteil an löslichem Protein und das damit verbundene stark verrauschte ESI-MS-Spektrum lassen vermuten, dass τ -hEGF zu dieser Proteinklasse gehört. Erschwerend kommt hinzu, dass

sich bereits bei der Expression und Reinigung (kein quantitativer Einbau und Reduktion des Azidohomoalaninrestes zum 2,4-Diaminobuttersäurerest) Probleme ergeben haben. Zusammengefasst bedeutet dies, dass bei jedem Protein geprüft werden muss, ob die Substitution von Methionin mit einer nicht-kanonischen Aminosäure effektiv durchgeführt werden kann und ob das Protein den Reaktionsbedingungen der CCHC standhält. Obwohl es viele Beispiele von erfolgreichen CCHC-Reaktionen mit Proteinen gibt (u. a. Glycosylierung von Barstar [siehe 2.3] sowie in der Literatur^{[92],[111]}), stellt sich die Frage, ob die Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition das Potential einer generellen chemischen Modifizierung – anwendbar auf die Mehrzahl von im Labor exprimierten Proteinen – besitzt. So ist z. B. ungeklärt, inwie weit Hefezellen Azide tolerieren. Trotz einzelner publizierter Ergebnisse^{[65],[128]} ist hier die Anwendung der CCHC – also die Reaktion eines Alkins mit einem Azid – noch unsicherer als in *E. coli*, da bekannt ist, dass Hefe-Zellen organische Azide zu Aminen reduzieren.^[96]

2.5 N-terminale Aminosäureabspaltung

2.5.1 N-terminale Aminosäureabspaltung bei hEGF

2.5.1.1 N-terminale Aminosäureabspaltung *in vitro*

Wie in Abb. 49 zu erkennen ist, wird durch die Substitution Met \rightarrow Hpg bzw. Met \rightarrow Aha ein verändertes Verhalten der N-terminalen Prozessierung durch *EcMetAP* beobachtet. Während im Fall der Met-Variante Met¹ fast quantitativ abgespalten worden ist, ergibt sich ein spiegelverkehrtes Bild für die Hpg-Variante. Hier wurde nur ein geringer Prozentsatz N-terminal prozessiert. Für die Aha-Variante ist auf Grund des komplexeren ESI-MS-Spektrums keine eindeutige Aussage möglich, allerdings scheinen sich hier prozessierter und nicht prozessierter Proteinanteil die Waage zu halten.

Da die N-terminale Methioninabspaltung (NME) eine häufig auftretende Proteinmodifizierung ist (siehe 1.2.3), die allerdings noch nicht vollständig verstanden ist, sollte im Folgenden der Einfluss von nicht-kanonischen Aminosäuren auf diesen Prozess untersucht werden. Da es sich bei der NME um einen cotranslationalen Vorgang handelt,^{[35],[37]} kann in *in vitro*-Assays durch kurze Peptide die wachsende Polypeptidkette nachgeahmt werden. Aus diesem Grund wurde eine Serie von Pentapeptiden synthetisiert, wobei als N-terminale Aminosäure jeweils Met¹, Hpg¹ und Aha¹ zum Einsatz kamen. In Position 2 der Sequenz wurde entweder Gly² oder Arg² verwendet, da ein kleiner Aminosäurerest in dieser Position NME begünstigen und ein großer verhindern soll (siehe 1.2.3). Die drei restlichen Aminosäuren Asn³Leu⁴Phe⁵ waren in allen Peptiden identisch.

Die auf diesem Wege als C-terminale Amide mit freiem N-Terminus synthetisierten Peptide (H-Xaa-Aaa-Asn-Leu-Phe-NH₂ mit Xaa = Met/Aha/Hpg und Aaa = Gly/Arg) wurden unter Bedingungen, die denen von LIAO *et al.*^[129] ähneln, mit kommerzieller MetAP

aus *Pyrococcus furiosus* versetzt, das dem entsprechenden *E. coli*-Enzym sehr ähnlich ist.^[36] Es wurde diese „klassische“ Variante des Assays verwendet, da nicht-kanonische Aminosäuren von Natur aus unphysiologisch sind und für die meisten Enzyme schlechte Substrate darstellen.^[130] Daher wurde darauf verzichtet, mit den von Frottin vorgeschlagenen – viel niedrigeren – physiologischen Konzentrationen zu arbeiten.^[131] Jeweils 10, 30, 60, 120, 300, 600, 1440 und 1980 min nach der Enzymzugabe wurden 40 μL der Reaktionslösung mit 10 μL 1 M Salzsäure versetzt. Daraufhin erfolgte eine Trennung mittels RP-HPLC und abschließend eine Integration über die Flächen der Signale in den Chromatogrammen, die dem Pentapeptid (N-terminale Aminosäure nicht abgespalten) bzw. dem Tetrapeptid (N-terminale Aminosäure abgespalten) zugeordnet wurden. Die Zuordnung der Signale zu den Peptiden erfolgte durch LC-ESI-MS-Messungen. Wie zu erwarten, trat keine N-terminale Prozessierung im Fall der Arg²-Peptide auf. In Abb. 51 ist daher nur eine repräsentative Grafik für die Peptide mit Gly² abgebildet.

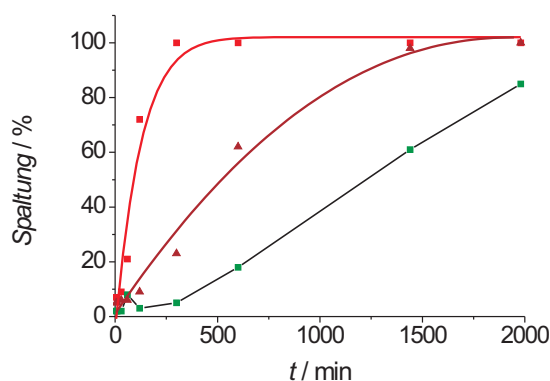


Abb. 51: *In vitro*-Assay zur N-terminalen Prozessierung durch *PfMetAP*. Eingesetzt wurden Peptide der Sequenz H-Xaa-Gly-Asn-Leu-Phe-NH₂ mit Xaa = Met¹ (rot) und den nicht-kanonischen Aminosäuren Hpg¹ (braun) und Aha¹ (grün). Im Falle von Met¹ und Hpg¹ wurden die Messpunkte mit einer Trendlinie verbunden. Im Fall von Aha¹ wurden die einzelnen Punkte zur besseren Orientierung mit Linien verbunden.

Wie eindeutig zu erkennen ist, unterscheiden sich die Peptide mit den N-terminalen nicht-kanonischen Aminosäuren in ihrem Verhalten sehr deutlich vom methionintragenden Peptid, aber auch stark voneinander. Erwartungsgemäß ergibt sich mit Methionin – dem natürlichen Substrat des Enzyms – die schnellste Spaltung. Für das Peptid mit Hpg¹ benötigt *PfMetAP* ungefähr das Achtfache an Zeit (1440 min), um es vollständig zu spalten. Aha¹ hingegen wird im beobachteten Zeitfenster nicht quantitativ abgespalten. Selbst nach 1980 min weisen noch ca. 15 % der Hexapeptide einen intakten N-Terminus auf.

Diese Ergebnisse stimmen im Großen und Ganzen mit den *in vivo*-Ergebnissen (siehe 2.4) überein – mit der Einschränkung, dass in den *in vitro*-Assays Hpg¹ schneller prozessiert

wird als Aha¹. Der Grund hierfür liegt aber wahrscheinlich in der Verwendung der MetAP aus *Pyrococcus furiosus*. Denn bisher wurden vergleichende Studien zwischen *EcMetAP* und *PfMetAP* nur mit Peptiden durchgeführt, die an N-terminaler Position 1 ein Methionin aufweisen. Es liegt daher nahe, dass sich die beiden Enzyme in ihrem Verhalten gegenüber Met ähneln, aber ein Unterschied in der Prozessierung von nicht-kanonischen Aminosäuren besteht. Um diese These zu überprüfen, wurde in einer folgenden Reihe von Assays reine *EcMetAP*^c verwendet. Es wurden auch höhere Enzymkonzentrationen gewählt (siehe 4), was zu einer Verkürzung der Versuchsdauer führte. In Abb. 52 ist eine repräsentative Grafik gezeigt.

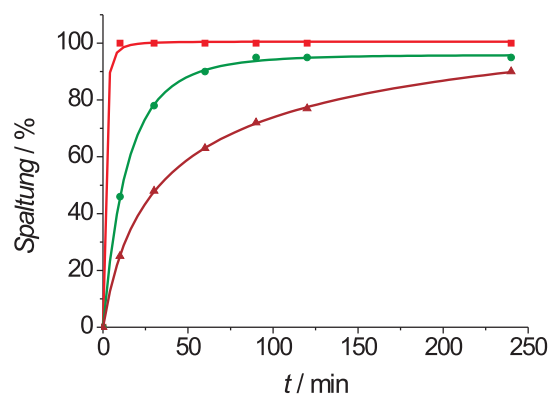


Abb. 52: *In vitro*-Assay zur N-terminalen Prozessierung durch *EcMetAP*. Eingesetzt wurden Peptide der Sequenz H-Xaa-Gly-Asn-Leu-Phe-NH₂ mit Xaa = Met¹ (rot) und den nicht-kanonischen Aminosäuren Hpg¹ (braun) und Aha¹ (grün). Die Messpunkte wurden jeweils mit Trendlinien verbunden.

Auch hier wird erwartungsgemäß das N-terminale Methionin am effektivsten prozessiert, während die Kurven für Aha und Hpg auf eine wesentlich langsamere Abspaltung schließen lassen. Im Gegensatz zu den Experimenten mit MetAP aus *Pyrococcus furiosus* (siehe Abb. 51) wird hier allerdings folgende Reihenfolge der Effektivität gefunden: Met > Aha > Hpg. Diese stimmt mit den *in vivo*-Ergebnissen (siehe 2.4) überein. Da gezeigt worden ist, dass auch nicht-kanonische Aminosäuren Substrate für die MetAP sind, wird die durch dieses Enzym verursachte Prozessierung im Folgenden nicht mehr mit NME (N-terminal methionine excision), sondern mit NRE (N-terminal residue excision) bezeichnet. Ausgehend von den gezeigten Ergebnissen lässt sich verallgemeinernd schließen, dass eine langsamere Prozessierung *in vitro* mit einer unvollständigen NRE *in vivo* korreliert.

^c*EcMetAP* war ein großzügiges Geschenk von Herrn Prof. Dr. Christian Klein, Heidelberg.

2.5.1.2 N-terminale Aminosäureabspaltung *in vivo*

Um diese Annahme zu untermauern, wurde eine Mutante vom reifen Protein des hEGF erzeugt. Bei der Mutation handelt es sich um den Austausch von Met gegen Isoleucin in Position 22. Das daraus resultierende rekombinante Protein wird Met¹-Arg²-Asn³- ψ -hEGF genannt und weist nur noch das N-terminale Methionin auf (siehe Abb. 53). Darüber hinaus wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem Arg² gegen Gly² ausgetauscht wurde, um Met¹-Gly²-Asn³- ψ -hEGF zu erhalten (siehe Abb. 53). Außerdem sind in Abb. 53 auch noch einmal die Aminosäuresequenzen für die τ -hEGF-Varianten aus 2.4 aufgeführt. Die Expression der ψ -hEGFs erfolgte analog zur Expression der τ -hEGFs (Details siehe 4).

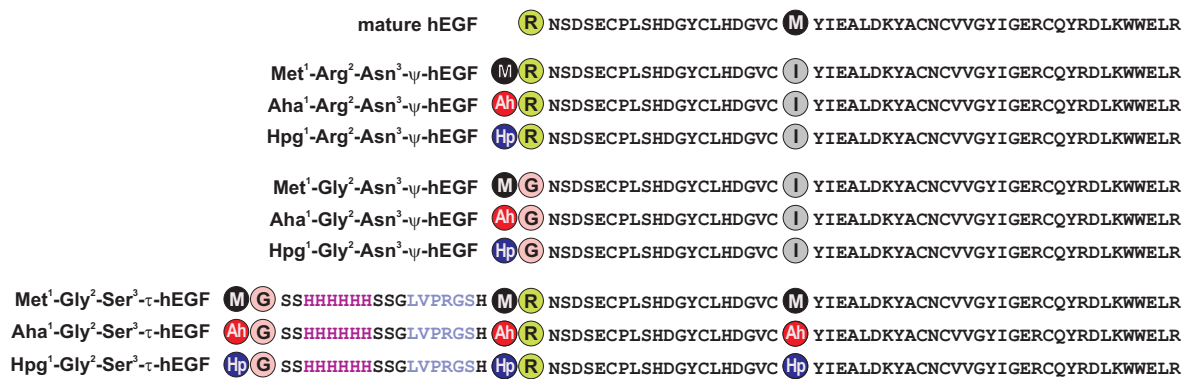


Abb. 53: Aminosäuresequenzen für das natürliche Reifeprotein des hEGF sowie die Mutanten Met¹-Arg²-Asn³- ψ -hEGF, Met¹-Gly²-Asn³- ψ -hEGF und τ -hEGF einschließlich ihrer Aha- und Hpg-Varianten.

Wie anhand der abgebildeten Aminosäuresequenzen zu erkennen ist, sind die ψ -hEGF-Mutanten und Varianten in den ersten drei Aminosäuren identisch mit den in 2.5.1 untersuchten Peptiden. Erwartungsgemäß wurde in keiner ψ -hEGF-Variante mit Arg² die N-terminale Aminosäure durch *EcMetAP* abgespalten (siehe Tab. 7).

Ein anderes Bild ergab sich bei der Expression von ψ -hEGF-Proteinen mit Gly². So wurden alle drei Varianten (Xaa¹-Gly²-Asn³- ψ -hEGF mit Xaa = Met/Aha/Hpg) in deutlich geringeren Ausbeuten exprimiert als die entsprechenden Proteine mit Arg². Diese Beobachtung steht allerdings im Einklang mit den Ergebnissen von LOOMAN, der β -Galaktosidasefusionsproteine systematisch im Hinblick auf die Expressionsausbeute in Abhängigkeit von der zweiten Aminosäure am N-Terminus untersucht hat.^[132] Interessanterweise ergab die Expression mit Aha¹ etwas mehr Protein als mit Met¹.

Die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure durch *EcMetAP* verlief allerdings entgegen den Erwartungen. Völlig überraschend konnte für Met¹ nur eine Spaltung von etwa 3 % detektiert werden, obwohl der entsprechende *in vitro*-Assay eine extrem schnelle und quantitative Prozessierung zeigte (siehe Abb. 52). Die NRE von Aha¹ war hingegen etwa um das Zehnfache effektiver, während im Fall von Hpg¹ der N-Terminus völlig unverändert

Tab. 7: Ergebnisse der ESI-MS-Analysen der ψ -hEGF-Mutanten und Varianten

Variante	M_{ber} / Da	M_{gef} / Da
Met ¹ -Arg ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6485	6484.9
Arg ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6354	—
Aha ¹ -Arg ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6480	6479.9
Arg ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6354	(Spuren detektiert)
Hpg ¹ -Arg ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6463	6462.9
Arg ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6354	—
Met ¹ -Gly ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6386	6385.8 (97 %)
Gly ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6255	6254.7 (3 %)
Aha ¹ -Gly ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6381	6384.8 (70 %)
Gly ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6255	6254.8 (30 %)
Hpg ¹ -Gly ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6364	6363.8
Gly ² -Asn ³ - ψ -hEGF	6255	—

blieb (siehe Tab. 7).

In der Literatur sind viele Beispiele bekannt, in denen Met¹ gespalten wird, wenn Gly² folgt. Allerdings zeigt u. a. die Studie von LINK, dass diese Spaltung nicht in allen Fällen quantitativ verläuft.^[34] Vor Kurzem veröffentlichte auch WANG Ergebnisse, die darauf schließen lassen, dass Gly² sich negativ auf die Effektivität der NRE auswirkt.^[97] So wurde für ein modifiziertes humanes Interferon- β gezeigt, dass die Spaltung von Aha¹ bzw. Hpg¹ im Fall von Gly² im Vergleich zu Ala² um die Hälfte bzw. auf ein Drittel reduziert wurde. Bemerkenswert ist aber auch, dass in dieser Studie Hpg ebenfalls tendenziell schlechter prozessiert wird als Aha.^[97]

Zusammenfassend lassen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse im Rahmen der N-terminalen Aminosäureabspaltung (NRE) den Schluss zu, dass vor allem im Hinblick auf den Einsatz von nicht-kanonischen Aminosäuren die Erstellung von allgemeingültigen Regeln zur Vorhersage von Quantität und Qualität der NRE nur schwer möglich ist. Mit Hilfe kurzer Modellpeptide kann allerdings eine Abschätzung erfolgen, wobei eine schnelle Kinetik *in vitro* mit einer hohen Effizienz *in vivo* korreliert. Eine langsame Spaltung *in vitro* hingegen macht einen unveränderten N-Terminus *in vivo* wahrscheinlich. Der Grund dieser Korrelation liegt möglicherweise darin, dass EcMetAP von der wachsenden Polypeptidkette *in vivo* die N-terminale Aminosäure nur spalten kann, wenn die Polypeptidkette eine bestimmte Länge und dadurch Konformation hat. Ein ähnliches Verhalten wurde für coumarinmarkierte N-Termini und deren Erkennung durch spezifische Antikörper gefunden.^[133]

Da das Verhältnis von Ribosom zu MetAP bei ungefähr 10:1^[41] liegt, ist ersichtlich, weshalb die oben erwähnte Korrelation gute Ergebnisse liefert. Denn während das Enzym ein schleches Substrat wie z. B. Hpg spaltet, d. h. mehr Zeit als für das natürliche Substrat Met benötigt, synthetisieren die Ribosomen, die durch die nicht-kanonische Aminosäure

nicht weiter beeinträchtigt werden, fortwährend das gewünschte Protein. Dadurch entsteht sozusagen unter kinetischer Kontrolle ein Großteil des Proteins mit unverändertem N-Terminus, was gleichbedeutend ist mit der nicht-kanonischen Aminosäure in Position 1.

Ein Vergleich der erzeugten *in vitro*-Ergebnisse mit den *in vivo*-Resultaten zeigt außerdem einen Einfluss der dritten Aminosäure auf die Effektivität der NRE. Besonders deutlich wird das am Beispiel von Met¹. Während das Peptid (mit Asn³) relativ schnell prozessiert wird, bleibt der N-Terminus im entsprechenden Protein (Met¹-Gly²-Asn³- ψ -hEGF) nahezu erhalten. In der τ -Variante mit Met¹-Gly²-Ser³ hingegen findet eine fast quantitative Spaltung statt. Für Aha¹ sind die Tendenzen ähnlich, wenn auch nicht so ausgeprägt (30 % bzw. 50 %), während Hpg in allen Fällen vollständig am N-Terminus erhalten bleibt. Die Begünstigung der NRE durch u. a. Ser³ wurde für ein N-terminales Met auch kürzlich von FROTTIN *et al.* beobachtet.^[131] Um zu überprüfen, ob diese für hEGF getroffenen Aussagen auch auf andere Proteine und nicht-kanonische Aminosäure zutreffen, wurden zusätzliche Assays durchgeführt.

2.5.2 N-Terminale Aminosäureabspaltung bei GFP und anxA5

2.5.2.1 N-Terminale Aminosäureabspaltung *in vitro*

Um die Untersuchungen zur NRE in Abhängigkeit der chemischen Natur der ersten Aminosäure zu intensivieren, wurden Peptide synthetisiert, die entweder Met¹, Aha¹, Cpa¹ (β -Cyclopropylalanin, **39**) oder Nle¹ (Norleucin, **40**) am N-Terminus aufweisen. Die Strukturen für Cpa und Nle sind in Abb. 54 gezeigt.

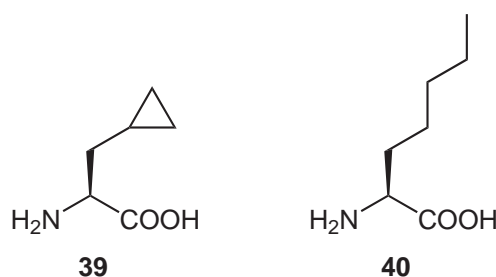


Abb. 54: Strukturen von Cpa (**XY**) und Nle (**XY**).

Norleucin ist seit Langem als guter Substituent von Methionin bekannt und wurde auch schon vereinzelt in *in vitro*-Assays eingesetzt.^{[40],[131],[134],[135]} Für das 1986 erstmals aus dem Pilz *Amanita virgineoides* Bas^[136] isolierte Cpa hingegen wurde erst kürzlich gezeigt, dass es translatorisch aktiv ist.^{[137],[138]} Zwar konnte in den beschriebenen *in vitro*-Experimenten nur eine Elongation, aber keine Initiation der Proteinbiosynthese mit Cpa nachgewiesen werden, jedoch konnte in unserer Arbeitsgruppe ψ -b* exprimiert werden, der bis zu 70 % Cpa¹ aufwies (Daten nicht gezeigt).

Tab. 8: Sequenzen der als C-terminale Amide synthetisierten Modellpeptide mit Ala² und Gly² sowie die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen. Außerdem ist die Effektivität der NRE nach 10 bzw. 300 min angegeben. Auf eine Auflistung der Arg²-Peptide wurde verzichtet, da bei ihnen keine Spaltung auftrat.

Sequenz	Spaltung / % t = 10 min	Spaltung / % t = 300 min
H-Met-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	93	100
H-Met-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	100	100
H-Met-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	49	100
H-Met-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	92	100
H-Met-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	100	100
H-Met-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	98	98
H-Aha-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	80	100
H-Aha-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	13	32
H-Aha-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	49	100
H-Aha-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	41	99
H-Aha-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	62	95
H-Aha-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	34	91
H-Cpa-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	—	—
H-Cpa-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	4	13
H-Cpa-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	14	72
H-Cpa-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	5	21
H-Cpa-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	9	43
H-Cpa-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	4	20
H-Nle-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	28	100
H-Nle-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	90	100
H-Nle-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	24	97
H-Nle-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	83	100
H-Nle-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	100	100
H-Nle-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	94	100

Ausgehend von anxA5 und EGFP (siehe 2.5.2.3) wurden insgesamt 32 Peptide synthetisiert (siehe Tab. 8). Dabei sind H-Met-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH₂ und H-Met-Gly-Ser-Ser-Leu-PheNH₂ in ihren ersten vier Aminosäuren identisch mit den unveränderten Modellproteinen. Neben der Variation der ersten Aminosäure (Met¹, Aha¹, Cpa¹ und Nle¹) wurden auch Veränderungen in der zweiten (Ala², Gly², Arg²) und dritten Position (Ser³ und Gln³) der Peptide vorgenommen, da in 2.5.1.2 gezeigt worden ist, dass diese beiden Reste eine entscheidende Auswirkung auf die Effektivität der NRE haben. Die dritte Aminosäure wurde allerdings nur im Fall von Gly² ausgetauscht, da sowohl die weiter oben gezeigten

Ergebnisse als auch die auf Met¹ bezogene Literatur verdeutlicht, dass der Einfluss der dritten Aminosäure auf Substrate mit Gly² einen größeren Effekt hat als auf diejenigen mit Ala². Leider erwies sich H-Cpa-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH₂ als unlöslich in dem für den Assay nötigen Lösungsmittelgemisch aus Wasser und DMSO.

Die Peptide wurden mit *EcMetAP* inkubiert (Details siehe 4), das Enzym nach 10, 30, 60, 90, 120 und 300 min mit Salzsäure deaktiviert und die Reaktionslösung mit Hilfe der RP-HPLC analysiert. Wie erwartet wurde für kein Peptid mit Arg² eine N-terminale Prozessierung beobachtet. In Abb. 55 ist die N-terminale Aminosäureabspaltung in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen Peptide mit Ala² und Gly² dargestellt.

Schon auf den ersten Blick ist deutlich zu erkennen, dass die N-terminale Aminosäureabspaltung bei Ala²-Peptiden wesentlich effektiver ist als bei Gly²-Peptiden. Darüber hinaus ist sie weitestgehend unabhängig von der Gesamtsequenz des jeweiligen Peptids. Eine Ausnahme bildet hier allerdings Cpa¹, wobei keine Aussage über die Prozessierung von H-Cpa-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH₂ getroffen werden kann, da das Peptid keine genügende Löslichkeit aufweist und somit nicht untersucht werden konnte. Allerdings wird vermutet, dass es eine ähnliche Kinetik wie H-Cpa-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH₂ zeigt.

Wie bereits erwähnt, wurden die N-terminalen Aminosäuren im Fall der Gly²-Peptide weniger effektiv gespalten. Des Weiteren scheinen auch hier wieder die nachfolgenden Aminosäuren – zumindest aber die Aminosäure in Position 3 – einen Einfluss auf die NRE zu haben, wie es für die weiter oben erwähnten hEGF-Mutanten und Varianten sowie in der Studie von FROTTIN *et al.*^[131] gefunden wurde.

Um den Einfluss der dritten Aminosäure auf die NRE näher zu untersuchen, wurde in den Peptiden mit Gly² jeweils die dritte Aminosäure ausgetauscht (Ser→Gln und *vice versa*, siehe Abb. 55 C und D bzw. E und F). Im Fall von Val⁴-Lys⁵-Tyr⁶ als Aminosäuren am C-Terminus ist kaum ein Unterschied nach dem Austausch zu erkennen (Abb. 55 D und F). Der Austausch von Ser³ (Abb. 55 C) mit Gln³ (Abb. 55 E) hat jedoch eine wesentlich verbesserte Spaltung für die Aha¹ bzw. Cpa¹-Peptide mit der C-terminalen Sequenz Ser-Leu-Phe zur Folge. Auch hier zeigt sich wieder, dass die NRE nicht durch vereinfachte „Faustregeln“ zufriedenstellend charakterisiert werden kann. So zeigen Peptide mit der kleinen – achiralen – Aminosäure Glycin an zweiter Stelle teilweise ein ganz anderes Verhalten als Peptide mit der kleinsten chiralen Aminosäure Alanin in Position 2. Dass der Austausch der dritten Aminosäure nicht in allen Fällen zu einer Änderung des Verhaltens bezüglich der NRE führt, lässt vermuten, dass es weitere Faktoren (z. B. weitere wichtige Aminosäurereste in der Sequenz) gibt, die diesen Prozess beeinflussen.

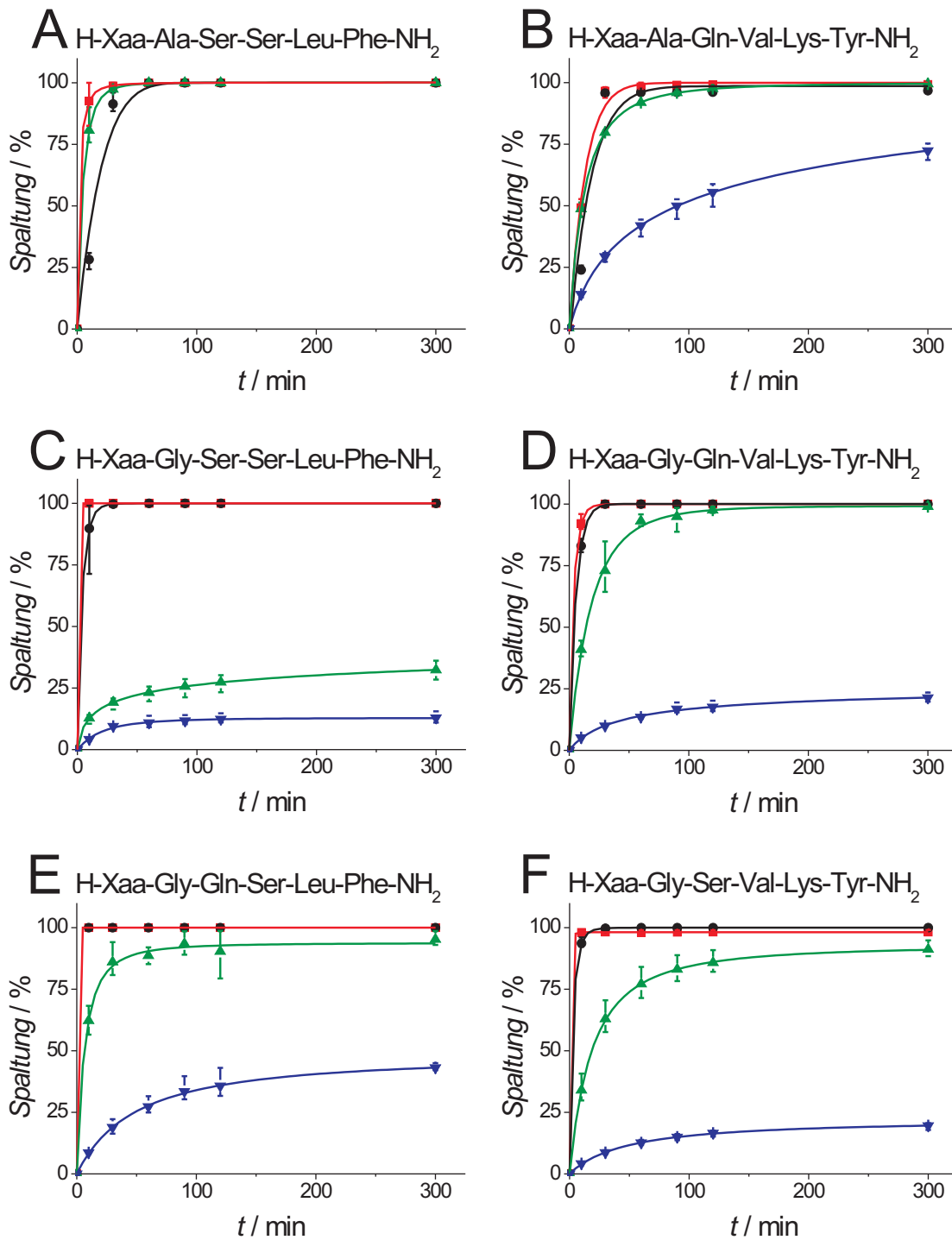


Abb. 55: Kinetiken der NRE von Peptiden mit Ala² (A und B) sowie Gly² (C – F) als zweite Aminosäure mit Xaa = Met (rot) / Nle (schwarz) / Aha (grün) / Cpa (blau). Die Peptide in C und E bzw. D und F unterscheiden sich in der Aminosäure in Position 3. In diesen Abbildungen überlagern sich die Graphen für Met¹ und Nle¹. Das in A fehlende CpaSSLF ist unter den für den Assay nötigen Bedingungen nicht löslich. Der Anteil an gespaltenem Peptid wurde durch RP-HPLC bestimmt und die Datenpunkte mit Trendlinien verbunden. Außerdem werden in den Diagrammen für jeden Datenpunkt der größte und kleinste Wert aus mindestens drei unabhängigen Messungen aufgeführt.

Dass Norleucin in der bisherigen Betrachtung unerwähnt geblieben ist, liegt an der Tatsache, dass es ein „perfektes“ Methioninanalogue ist. Wie Abb. 55 zu entnehmen ist, sind alle Peptide, die Nle¹ aufweisen, innerhalb von 60 min vollständig prozessiert. Betrachtet man allerdings die ersten 10 min der Reaktion, werden Unterschiede sichtbar (siehe Tab. 8). Während Nle¹ von fast allen Peptiden mit Gly² innerhalb von 10 min abgespalten wird, werden die Ala²-Peptide deutlich langsamer in diesem Zeitraum prozessiert (24 und 28 %). Die Peptide mit Met¹ zeigen ein ähnliches Verhalten.

Die Daten für Aha¹ und Cpa¹ sind weitaus komplexer. Als generelle Tendenz lässt sich allerdings aus Tab. 8 ablesen, dass Ala²-Peptide besser prozessiert werden als Gly²-Peptide, von denen H-Aha-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH₂ und H-Cpa-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH₂ die besten Substrate darstellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass größere Reste in Position 3 die N-terminale Prozessierung durch *EcMetAP* begünstigen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass – mit Ausnahme der Nle¹-Peptide – H-Xaa-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH₂ (mit Xaa = Aha/Cpa) das schlechteste Substrat jeder Serie ist. Die Effektivität der NRE ist in den entsprechenden Gln³-Peptiden jeweils zwei- bis viermal höher. Um die bisherigen Ergebnisse zusammenzufassen, sind in Abb. 56 die NRE-Effektivitäten für jedes Peptid nach 60 min dargestellt. Dieser Zeitpunkt stellt einen guten Kompromiss zwischen den ersten 10 min und dem Endwert nach 300 min dar.

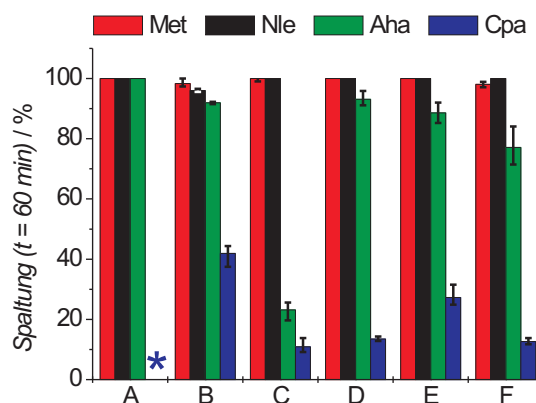


Abb. 56: Effektivität der NRE bei $t = 60$ Minuten für die einzelnen Peptide mit A: H-Xaa-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH₂, B: H-Xaa-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH₂, C: H-Xaa-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH₂, D: H-Xaa-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH₂, E: H-Xaa-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH₂, F: H-Xaa-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH₂. Es sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Fehlerbalken aus drei unabhängigen Messungen angegeben. * Dieser Wert konnte nicht bestimmt werden, da das entsprechende Substrat unlöslich war.

Wie bereits erwähnt sind sämtliche Nle¹-Peptide (schwarz) und fast alle Met¹-Peptide (rot) nach 60 Minuten quantitativ prozessiert. Aha¹-Peptide sind gute Substrate, wenn Ala² folgt. Der erwähnte positive Effekt von Gln³ wird vor allem in den Peptiden H-Aha-

Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH₂ (vergleiche H-Aha-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH₂) und H-Cpa-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH₂ sowie H-Cpa-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH₂ deutlich. Überraschend ist die Tatsache, dass Nle¹ und Met¹ im Fall von Gly² schneller prozessiert werden, Aha¹ und Cpa¹ hingegen bessere Ergebnisse durch Ala² erzielen, wobei die generell schlechte Spaltung von Cpa¹ darauf schließen lässt, dass diese Aminosäure an sich ein schlechtes Substrat für *EcMetAP* ist. Dies kann unter anderem an der verzweigten Seitenkette liegen – denn genau wie Cpa sind auch Leucin und Valin schlechte Substrate für *EcMetAP*.^[131]

Was den Einfluss der dritten Aminosäure betrifft, stehen die hier gezeigten Ergebnisse in Widerspruch zu den Daten von FROTTIN *et al.*^[131] In einer systematischen Studie untersuchten sie die N-terminale Methioninabspaltung *in vitro*. Für Met¹ wurde gezeigt, dass Trp³, Met³ und Ser³ die Prozessierung am stärksten unterstützen. Wie in Abb. 55 gezeigt wird, wirkt sich in den hier verwendeten Peptiden Ser³ teilweise negativ auf die NRE aus, während Gln³ wesentlich bessere Resultate erzielt. Ein Grund für diesen Unterschied kann sein, dass FROTTIN *et al.* Tripeptide verwendet haben, in dieser Arbeit aber Penta- bzw. Hexapeptide eingesetzt wurden und FROTTIN *et al.* selbst einen Einfluss auf die NRE durch eine längere Sequenz festgestellt haben. Des Weiteren unterscheiden sich die verwendeten Peptidkonzentrationen von den von FROTTIN und Mitarbeitern beschriebenen. Die Enzymkonzentrationen hingegen waren ähnlich hoch. Abschließend soll auch noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Verwendung nicht-kanonischer Aminosäuren liegt und somit – wenn überhaupt – die Daten der Met¹-Peptide mit denen von FROTTIN *et al.* verglichen werden können. Die hier gefundenen Werte stehen allerdings auch im Widerspruch zu den Ergebnissen der *in vivo*-NRE von hEGF-Mutanten und Varianten (siehe 2.5.1.2), bei denen sich Ser³ positiv auf die NRE ausgewirkt hat.

2.5.2.2 Charakterisierung und Expression der GFP- und Annexinmutanten

Um zu überprüfen, ob die soeben beschriebenen Tendenzen sich auf die N-terminale Prozessierung *in vivo* übertragen lassen, wurden Annexin- und GFP-Mutanten unter den Bedingungen der SPI-Methode exprimiert. Diese beiden Proteine werden jeweils in löslicher Form exprimiert, unterscheiden sich aber in ihrer Größe und in ihren Sekundär- sowie dreidimensionalen Strukturen.

Das in dieser Arbeit verwendete humane Annexin 5 (anxA5) bindet wie alle Vertreter dieser Proteinfamilie in einem von Calcium abhängigen Mechanismus an Phospholipidmembranen. Annexine treten in allen Lebensformen (Tiere, Pflanzen, Pilze etc.) auf und von vielen ist ihre blutgerinnungs- sowie entzündungshemmende Wirkung bekannt.^[139] Fluoreszenzmarkiertes anxA5 ist ein häufig verwendeter Marker in Apoptose-Studien. Humanes anxA5 besteht aus 320 Aminosäuren ($M \approx 35900 \text{ g mol}^{-1}$) und weist in seiner Sekundärstruktur ausschließlich α -Helices auf. Die dreidimensionale Struktur von anxA5

wird aus vier gleich strukturierten Domänen gebildet, die jeweils aus fünf α -Helices bestehen, die zu einer rechtshändigen Superhelix gewunden sind (siehe Abb. 57). Die Aminosäuresequenz von anxA5 beginnt mit Met¹-Ala²-Gln³-Val⁴... (siehe Anhang) und ist somit vergleichbar mit dem Peptid H-Met-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH₂ aus 2.5.2.1. Zusätzlich wurden Annexinmutanten mit Glycin in Position 2 (anxA5(A2G)) bzw. Arginin in Position 2 (anxA5(A2R)) hergestellt.

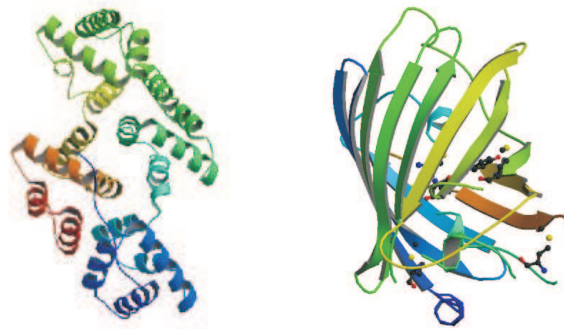


Abb. 57: Ribbon-Diagramme der dreidimensionalen Strukturen von anxA5^[140] (links) und GFP^[141] (rechts).

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein sekundäres Photoprotein, das erstmals aus der Qualle *A. victoria* isoliert worden ist. Seinen Namen hat das Protein durch die charakteristische grüne Fluoreszenz (Emissionsmaximum ca 504 nm) nach der Anregung mit UV-Licht erhalten – in der Natur wandelt GFP die blaue Chemolumineszenz des Proteins Aequorin in grüne Fluoreszenz um.^{[142],[143]} GFP ist ein sehr stabiles Protein, das aus 238 Aminosäuren besteht ($M \approx 26900 \text{ g mol}^{-1}$) und in dessen dreidimensionale Struktur 11 β -Faltblätter dominieren, die eine coaxiale Helix bilden, die in ihrem Zentrum den Chromophor beherbergt (siehe Abb. 57). Da der Chromophor autokatalytisch gebildet wird, d. h. keine weiteren Enzyme oder Cofaktoren benötigt werden, haben sich GFP-markierte Proteine zu einem weit verbreiteten Handwerkszeug in der Zellbiologie entwickelt.^{[144],[145]}

Das in dieser Arbeit verwendete eGFP beruht auf der EGFP-Mutante, die neben einer Codonoptimierung^[146] für die Expression in Eukaryoten die Mutationen Phe64Leu und Ser65Thr aufweist.^[147] Darüber hinaus enthält EGFP einen C-terminalen 6×His-Tag. Um die N-terminale Prozessierung des Proteins besser studieren zu können, wurde zwischen Met¹ und Val² eine Sequenz von drei Aminosäuren (Gly-Ser-Ser) eingefügt, so dass sich eine Aminosäuresequenz von Met¹-Gly²-Ser³-Ser⁴-Val⁵... ergibt (siehe Anhang). Diese Mutante wurde eGFP genannt und ist mit dem Peptid H-Met-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH₂ vergleichbar (siehe 2.5.2.1). Außerdem wurde die Aminosäure in Position 2 wie folgt verändert: Gly2Ala (eGFP(G2A)) und Gly2Arg (eGFP(G2R)). Insgesamt wurden die in Tab. 9 aufgelisteten Proteine exprimiert.

Tab. 9: Bezeichnungen der exprimierten anxA5- und eGFP-Mutanten sowie deren Varianten. Außerdem sind jeweils die ersten vier N-terminalen Aminosäuren mit angegeben.

Bezeichnung	N-Terminus	Bezeichnung	N-Terminus
Met-anxA5	Met ¹ -Ala ² -Gln ³ -Val ⁴	Met-anxA5(A2G)	Met ¹ -Gly ² -Gln ³ -Val ⁴
Aha-anxA5	Aha ¹ -Ala ² -Gln ³ -Val ⁴	Aha-anxA5(A2G)	Aha ¹ -Gly ² -Gln ³ -Val ⁴
Met-anxA5(A2R)	Met ¹ -Arg ² -Gln ³ -Val ⁴		
Aha-anxA5(A2R)	Aha ¹ -Arg ² -Gln ³ -Val ⁴		
Met-eGFP	Met ¹ -Gly ² -Ser ³ -Ser ⁴	Met-eGFP(G2A)	Met ¹ -Ala ² -Ser ³ -Ser ⁴
Aha-eGFP	Aha ¹ -Gly ² -Ser ³ -Ser ⁴	Aha-eGFP(G2A)	Aha ¹ -Ala ² -Ser ³ -Ser ⁴
Cpa-eGFP	Cpa ¹ -Gly ² -Ser ³ -Ser ⁴	Cpa-eGFP(G2A)	Cpa ¹ -Ala ² -Ser ³ -Ser ⁴
Nle-eGFP	Cpa ¹ -Gly ² -Ser ³ -Ser ⁴	Nle-eGFP(G2A)	Cpa ¹ -Ala ² -Ser ³ -Ser ⁴
Met-eGFP(G2R)	Met ¹ -Arg ² -Ser ³ -Ser ⁴		
Aha-eGFP(G2R)	Aha ¹ -Arg ² -Ser ³ -Ser ⁴		
Cpa-eGFP(G2R)	Cpa ¹ -Arg ² -Ser ³ -Ser ⁴		
Nle-eGFP(G2R)	Nle ¹ -Arg ² -Ser ³ -Ser ⁴		

Die Expression und Reinigung der anxA5-Mutanten und Varianten erfolgten nach der in 4 beschriebenen Art und Weise. Während die Met- und Aha-haltigen Proteine ungefähr gleiche Ausbeuten lieferten, konnten jeweils nur geringe Mengen mit Nle- bzw. Cpa-haltigen Spezies isoliert werden, die allerdings sehr schnell aggregierten und somit nicht durch LC-MS-Analysen untersucht werden konnten.

Ähnliche Tendenzen in Bezug auf die Ausbeute zeigten sich auch bei der Expression der eGFP-Mutanten und Varianten. Zellsuspensionen, denen Cpa oder Nle zugesetzt wurden, exprimierten kaum farbige eGFP-Varianten. Zellkulturen, denen Aha zugesetzt wurde, waren leicht grün gefärbt, während die Kontrollkulturen, deren Medium ausschließlich Met enthielt, deutlich grün gefärbt waren. Ein Grund für diesen Unterschied könnte sein, dass mit Met⁸² ein Methioninrest in der Nachbarschaft des Chromophors vorliegt. Eine Änderung der chemischen Natur – und somit auch der Polarität – der entsprechenden Seitenkette könnte einen Einfluss auf den Chromophor haben. Des Weiteren wurde bei der Expression deutlich, dass Met-eGFP schlechter exprimiert wurde als die Mutante mit Ala² und Arg². Dies bestätigt die Beobachtungen von LOOMAN,^[132] HIREL *et al.*^[41] sowie DALBOGE *et al.*,^[42] die ebenfalls zum Teil beachtliche Unterschiede in der Proteinexpression nach einem Austausch von Ala²Gly oder *vice versa* bemerkt haben. Die Reinigung der löslichen eGFP-Mutanten und Varianten erfolgte mittels Ni-NTA-Chromatographie. Zur Identifizierung der Proteine wurden LC-MS-Analysen durchgeführt. Durch die massenspektrometrischen Untersuchungen sollte auch geklärt werden, ob die N-terminale Amino-

säure *in vivo* abgespalten wird oder nicht. Allerdings wurde Aha-eGFP(G2R) in Inclusion bodies exprimiert und konnte daher nicht durch LC-ESI-MS-Untersuchungen analysiert werden. Darüber hinaus konnte im Fall von Nle-eGFP(G2R) und Cpa-eGFP(G2R) nicht das gewünschte Protein detektiert werden.

2.5.2.3 N-terminale Aminosäureabspaltung *in vivo* von Annexin und GFP

Aus den Spektren (Details der Auswertung siehe Anhang B) der massenspektrometrischen Analysen geht hervor, dass Met¹ erwartungsgemäß von allen Proteinen mit Gly² und Ala² gespalten wird, bei Arg² hingegen bleibt der N-Terminus des jeweiligen Proteins unverändert. Dies wurde auch in den *in vitro*-Assays (siehe 2.5.2.1) vorhergesagt.

Die Interpretation der Spektren für Proteine, die in Anwesenheit von nicht-kanonischen Aminosäuren exprimiert wurden, ist wesentlich schwieriger. Zum einen konnte kein Protein mit quantitativer Methioninsubstitution exprimiert werden, d. h., die Substitution der sechs (eGFP) bzw. acht (anxA5) Methionine durch nicht-kanonische Aminosäuren erfolgte statistisch. Zum anderen wiesen die Aha-eGFP-Proben einen geringen Anteil an 2,4-Diaminobuttersäureresten auf, was auf eine partielle Reduktion von Aha (**10**) zu DAB schließen lässt. Da eGFP als lösliches Protein exprimiert wird, ist dieses Verhalten zu erwarten (siehe 1.5). Allerdings fand die Reduktion im Fall der eGFP-Mutanten und Varianten im Vergleich zu τ -hEGF in wesentlich geringerem Ausmaß statt und blieb bei der Auswertung unberücksichtigt.

Generell lässt sich aber trotz der beschriebenen Schwierigkeiten zusammenfassen, dass Aha¹ vollständig prozessiert wird, wenn die zweite Aminosäure Alanin ist. Im Fall von Gly² werden jeweils auch Proteine mit unverändertem N-Terminus detektiert. Dass zudem z. B. in der Probe von Aha-eGFP auch unprozessiertes Met-eGFP (kein Met durch Aha ersetzt) gefunden worden ist – im Gegensatz zur „reinen“ Met-eGFP-Probe –, bestätigt die weiter oben getroffene Vermutung, dass während der langsameren Proteinprozessierung durch *EcMetAP* die Proteinbiosynthese unverändert weiterläuft und *EcMetAP* nur Polypeptidketten einer bestimmten Länge prozessieren kann.

Im Fall von Cpa¹ stehen die *in vivo*-Daten im Kontrast zu den *in vitro*-Daten. So wurden nach der Proteinexpression ausschließlich N-terminal prozessierte Spezies gefunden. Die Assays mit den entsprechenden Peptiden ergaben allerdings jeweils nur eine geringe Prozessierung. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Cpa-eGFP-Mutanten mit Met¹ initiiert worden sind, welches im Fall von Ala² bzw. Gly² prozessiert worden ist. Gestützt wird diese Vermutung durch Beobachtungen zur *in vitro*-Proteinsynthese, die ergeben haben, dass Cpa ein schlechter Initiator ist, aber innerhalb der Sequenz anstelle von Met eingebaut werden kann.^{[137],[138]} Die Werte für Nle¹ bestätigen hingegen wieder voll und ganz die Ergebnisse aus den *in vitro*-Assays.

Alles in allem verdeutlichen die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-

Experimente, dass für die Prozessierung nicht-kanonischer Aminosäuren am N-Terminus im Großen und Ganzen den Tendenzen für die N-terminale Methioninabspaltung folgt. Allerdings erzeugen die langsameren Kinetiken der NRE im Fall der Methioninanaloga, die darauf beruhen, dass nicht-kanonische Aminosäuren im Allgemeinen schlechtere Substrate für natürliche Enzyme sind, Abstufungen in der Effektivität der Spaltung. Im Fall von Hpg kann dies sogar so weit führen, dass der N-Terminus nahezu völlig unverändert bleibt. Daher können die in der Einleitung erwähnten „Faustregeln“ zur Vorhersage der NRE nur mit Vorsicht auf nicht-kanonische Aminosäuren angewendet werden.

Interessanterweise ähneln die „Faustregeln“ zur Abspaltung von N-terminalem Methionin der sogenannten „N-end rule“.^[148] Diese korreliert die Proteinstabilität mit der N-terminalen Aminosäure, wobei kleine Aminosäurereste (einschließlich Methionin) einen stabilisierenden und große Aminosäurereste einen destabilisierenden Effekt aufweisen. Durch den Einsatz von nicht-kanonischen Aminosäuren am N-Terminus wird also nicht nur die N-terminale Prozessierung verändert. Sie wird sich höchstwahrscheinlich auch auf die Stabilität des Proteins auswirken. Vereinzelt Experimente stützen diese Vermutung, allerdings fehlt noch eine große, systematische Untersuchung in diesem Bereich.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Expression von Modellproteinen, deren Methioninreste durch Methioninanaloga substituiert sind. Durch die somit erzielte Einführung neuer chemischer Funktionalitäten sollte eine spätere selektive chemische Modifizierung möglich sein. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich azid- bzw. alkinhaltige Aminosäuren als Methioninanaloga verwendet. Sowohl die Alkin- als auch die Azid-Gruppe ist orthogonal zur Chemie der weiteren Aminosäuren im Protein, d. h., mit Hilfe der Kupfer-katalysierten Huisgen-Cycloaddition (CCHC) können diese beiden Gruppen gezielt mit einem organisch-chemischen Molekül konjugiert werden. Nachteilig kann sich aber im Fall von azidhaltigen Aminosäuren die Reduktion in der Zelle zu 2,4-Diaminobuttersäure durch Glutathion auswirken.

Zunächst wurden entsprechende Vorarbeiten zur CCHC auf der Ebene von Peptiden durchgeführt. Dazu wurde ein Peptid, das dem MOG-ähnlichen Peptid CSF114(Glc) gleicht, welches ein hohes Potential in der Diagnose der Multiplen Sklerose (MS) aufweist, synthetisiert. Bei dem in dieser Arbeit hergestellten Peptid wurde die Aminosäure Propargylglycin in die Sequenz anstelle eines Asparagins eingeführt. Nach der Reinigung konnte die Alkinfunktion quantitativ mit einem azidderivatisierten Kohlenhydrat konjugiert werden. In den anschließenden ELISA-Tests wurde allerdings eine im Vergleich zu CSF114(Glc) wesentlich schlechtere Affinität zu den MS-relevanten Antikörpern detektiert. Dies wurde auf den etwas größeren sterischen Bedarf des Triazolrings im Vergleich zur Bindung im Fall von Asn(Glc) zurückgeführt.

Trotzdem sollten azid- und alkinhaltige Aminosäuren *in vivo* in Proteine eingebaut werden. Diese Aminosäuren wurden teilweise im Verlauf dieser Arbeit mittels klassischer organisch-chemischer Synthese oder enzymatisch hergestellt. Anschließend erfolgten Einbauexperimente, bei denen L-Azidohomoalanin (Aha, **10**) und L-Homopropargylglycin (Hpg, **11**) jeweils nahezu quantitativ den einzigen Methioninrest im Modellprotein Barstar ersetzen. Die resultierenden Proteine konnten durch die CCHC mit Derivaten des Fluoresceins konjugiert werden. Die azid- bzw. alkinfunktionalisierten Fluoresceinderivate wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Anschließend erfolgte die Konjugation zwischen der Barstar-Variante mit eingebautem Aha (**10**) und zwei verschiedenen alkinderivatisierten Kohlenhydraten. Auch hier konnte ein vollständiger Umsatz zum gewünschten Produkt detektiert werden. Durch die Konjugation gelang es, dem Modellprotein zu seiner natürlichen Funktion der Barnaseinhibition eine weitere – die der Lectinbindung – hinzuzufügen. Anschließende biophysikalische Untersuchungen ergaben, dass durch die Met→Aha-Substitution und die anschließende Konjugation der Schmelzpunkt des Proteins um ca. 4 °C erniedrigt wird, sich im Ganzen aber eine etwas geordnetere Struktur des Proteins ergibt.

Konjugationsversuche von Mutanten des humanen Epidermal Growth Factors (hEGF) verliefen hingegen nicht quantitativ. Hier erfolgte eine deutliche Reduktion der Azidohomoalaninreste zu 2,4-Diaminobuttersäureresten. Erfolgreicher verlief hingegen der Einbau von Hpg. Allerdings konnte nach einer Met→Hpg-Substitution nur ein Teil der Alkinfunktionalitäten mit einem azidhaltigen Kohlenhydrat verknüpft werden. Bei der Expression der entsprechenden Varianten wurde außerdem ein unterschiedliches Verhalten von Met- ψ -hEGF, Hpg- ψ -hEGF und Aha- ψ -hEGF hinsichtlich ihrer N-terminalen Prozessierung durch die Methioninaminopeptidase (*EcMetAP*) beobachtet.

Um diesen Unterschied näher zu untersuchen, wurden verschiedene Serien von Peptiden hergestellt, wobei folgende Aminosäuren die N-terminale Position einnahmen: Met, Hpg, Aha, β -Cyclopropylglycin (Cpa, **39**) und Norleucin (Nle, **40**). Bei diesen Studien zeigte sich, dass Met und Nle sich in ihrem Verhalten hinsichtlich der N-terminalen Prozessierung durch *EcMetAP* kaum unterscheiden. Die Resultate der anderen drei Analoga sind wesentlich komplexer, lassen sich aber verallgemeinernd wie folgt zusammenfassen: Aha wird effektiver prozessiert als Hpg und Cpa. Eine Besonderheit liegt in der Relevanz der zweiten Aminosäure. Gilt im Fall von Methionin die Faustregel „bei kleinen Aminosäuren in Position 2 erfolgt N-terminale Methioninabspaltung, bei großen Aminosäuren in Position 2 bleibt das Methionin erhalten“, so macht es im Fall der nicht-kanonischen Aminosäuren am N-Terminus einen Unterschied, ob die kleine, achirale Aminosäure Glycin oder die kleinste chirale Aminosäure Alanin die Position 2 am N-Terminus besetzt. Die Gly²-Peptide wurden im Fall von Aha, Hpg und Cpa durchweg schlechter prozessiert als die entsprechenden Ala²-Peptide. Darüber hinaus scheint der Rest der Peptidsequenz, zumindest aber die dritte Aminosäure, ebenfalls einen Einfluss auf die Prozessierung durch *EcMetAP* zu haben.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Modellproteinen mit nicht-kanonischen Aminosäuren und deren anschließende posttranslationale Modifizierung zu stabilen Proteinen führen kann. Durch die Modifizierung, die auf Grund der Einführung neuer chemischer Funktionalitäten in die Proteinsequenz gezielt erfolgen kann, kann das Protein eine zusätzliche Funktionalität erhalten. Im Hinblick auf die bisher mit Problemen behaftete Erzeugung von definiert glycosylierten Proteinen können die Resultate der vorliegenden Arbeit von großem Nutzen sein. Interessant ist auch die Kombination von veränderter N-terminaler Prozessierung durch *EcMetAP* mittels Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren und die anschließende chemische Modifizierung des N-Terminus. Von Bedeutung wird in Zukunft aber auch die Etablierung einer neuen Konjugationschemie auf Proteinebene sein, da die CCHC auch Probleme mit sich bringt. So ist für *in vivo*-Experimente der Einsatz von Kupfer auf Grund seiner toxischen Eigenschaften von Nachteil. Aber auch die durch Kupfer vermittelte Aggregation von Proteinen ist problematisch und steht einer generellen Anwendung dieser Methode im Wege.

4 Experimenteller Teil

4.1 Allgemeines, analytische Methoden und Geräte

Lösungsmittel. Die für die Synthesen und Analysen benötigten Lösungsmittel wurden von SIGMA-ALDRICH (Schnelldorf, D), MERCK (Darmstadt, D), RIEDEL-DE HAËN (Seelze, D) und FLUKA (Buchs, CH) in p.a. Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das für die HPLC-Systeme benötigte Acetonitril (LiChrosolv) lieferte die Firma MERCK.

Chemikalien: Alle gängigen Chemikalien wurden bei den oben genannten Firmen käuflich erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Fmoc-Propargylglycin wurde bei ADVANCED CHEMTECH (Louisvill, USA) gekauft, alle weiteren geschützten Aminosäuren bei der Firma IRIS BIOTECH GMBH (Marktrechwitz, D). Das als Polymermatrix eingesetzte TentaGel S Ram stammte von RAPP POLYMERE (Tübingen, D). Propargyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid und Propargyl-2-acetamido-2-deoxy-4-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid wurden von Prof. Dr. VALENTIN WITTMAN (Konstanz, D) zur Verfügung gestellt. Das Enzym *Pf*MetAP wurde bei SIGMA-ALDRICH erworben und *Ec*MetAP von Prof. Dr. CHRISTIAN KLEIN (Heidelberg, D) zur Verfügung gestellt. Barnase war ein großzügiges Geschenk von Dr. RALPH GOLBIK (Halle, D). FluoresceindArGdAdA-TAMRA wurde bei INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (Leuven, B) erworben.

Peptidsynthesizer: Für die automatisierte Peptidsynthese wurde ein Continuous-Flow-Synthesizer des Typs Pioneer Peptide Synthesis System (Modell GEN600611) der Firma PERSEPTIVE BIOSYSTEMS INC. (Framingham, USA) eingesetzt.

Analytische RP-HPLC (aHPLC): Zur Analyse mittels RP-HPLC wurde eine Anlage der Firma WATERS (Eschborn, D) eingesetzt, die aus zwei HPLC-Pumpen (Modell 515), einem Autosampler (717 plus), einem Datamodul/Controller (600 S) und einem Photodioden Array Detektor (996) bestand. Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde die Software Millennium³² (WATERS) eingesetzt.

aHPLC1: Die Trennung der Proben erfolgte mittels einer X-Terra-MS C-8, 5 μ m, 3,19 \times 150 mm Säule (WATERS) und einem Gradienten von 100 % A (2%ige Phosphorsäure/Acetonitril 95:5, V/V) nach 100 % B (2%ige Phosphorsäure/Acetonitril 10:90, V/V) in 17 min bei einer Flussrate von 1,5 mL min⁻¹.

aHPLC2: Die Trennung der Proben erfolgte mittels einer Säule des Typs ET 125/4 Nucleosil 100-5 C8 der Firma MACHEREY & NAGEL (Düren, D) und einem Gradienten von 95 % A (0,1 % TFA in Wasser, V/V) nach 90 % B (0,08 % TFA in Acetonitril, V/V)

in 18 Minuten bei einer Flussrate von $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

aHPLC3: Die Trennung der Proben erfolgte mittels einer Säule des Typs ET 125/4 Nucleosil 100-5 C8 der Firma MACHEREY & NAGEL (Düren, D) und einem Gradienten von 95 % A (0,1 % TFA in Wasser, V/V) nach 90 % B (0,08 % TFA in Acetonitril, V/V) in 13 Minuten bei einer Flussrate von $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

aHPLC4: Die Trennung der Proben erfolgte mittels einer Säule des Typs YMC-Pack PROTEIN-RP, 250", 4,6 mm, S-5 der Firma YMC EUROPE GMBH (Dinslaken, D) und einem Gradienten von 100 % A (0,1 % TFA in Wasser, V/V) nach 45 % B (0,08 % TFA in Acetonitril, V/V) in 45 Minuten bei einer Flussrate von $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Präparative RP-HPLC (pHPLC): Zur präparativen Reinigung der Substanzen wurde eine HPLC-Anlage der Firma GILSON ABIMED (Langenfeld, D) eingesetzt, die aus folgenden Komponenten bestand: Pumpe 321, UV/Vis-Detektor 152, Interface 506 C und Fraktionssammler Model 202.

Die Steuerung und Datenverarbeitung erfolgte über die Software UniPoint (V 2.10) der Firma GILSON (Middleton, USA).

Die Trennung der Produktgemische erfolgte über die Säulen 250/21 Nucleosil 100-5 C18 bzw. 250/21 Nucleodur 100-5 C8 ec und die Eluenten A (0,1 % TFA in Wasser, V/V) und B (0,08 % TFA in Acetonitril, V/V). Der Gradient wurde jeweils wie folgt definiert: 7 Minuten 10 % B, anschließend innerhalb von 59 Minuten den Anteil an B linear auf 40 % steigern, dann in 4 Minuten linear auf 95 % B und für 10 Minuten isokratisch eluieren. Abschließend wurde der Anteil von B in 5 Minuten auf 10 % gesenkt und dann für 10 Minuten isokratisch eluiert.

ESI-Massenspektrometrie: Die ESI-MS-Spektren wurden an einem Single-Quadrupol-Spektrometer des Typs PE SCIEX API 165 der Firma PE SCIEX (Forster City, USA) aufgenommen.

Zur kombinierten LC-MS-Analyse wurde ein HPLC-System eingesetzt, das aus einem Microgradienten Pumpensystem 140 C der Firma APPLIED BIOSYSTEMS (Forster City, USA), einem Autosampler Series 200 von PERKIN ELMER (Überlingen, D) und einem UV/Vis Detektor Series 1100 der Firma AGILENT (Palo Alto, USA) besteht. Als Trennsäule wurde eine X-Bridge C8 Säule ($5 \mu\text{m}$, $100 \times 2,1 \text{ mm}$) der Firma WATERS mit einem Fluss von $250 \mu\text{L min}^{-1}$ und einem Gradienten von 95 % A (0,05 % TFA in Wasser, V/V) nach 95 % B (0,05 % TFA in Acetonitril, V/V) in 15 min verwendet. Entsprechende Retentionszeiten sind unter der Bezeichnung LC-MS angegeben. Die Spektren wurden mittels der Software BioMultiView 1.5.1 der Firma PE SCIEX (Ontario, CAN) ausgewertet.

Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einem micro-TOF-LC-Massenspektrometer der Firma BRUKER DALTONICS (Bremen, D) aufgenommen. Zur kombinierten LC-MS-

Analyse wurde das HPLC-System Series 1100 der Firma AGILENT eingesetzt, das aus Pumpe, Entgaser, Autosampler, Säulenofen und Detektor bestand. Die Steuerung erfolgte mittels der Software Compass 1.1 für microTOF, die die Programme HyStar 3.1.52, microTOF Fcontrol 1.1.59 sowie Data Analysis 3.3.149 beinhaltet. Die Proben wurden auf einer Waters Symmetry C4 Säule der Firma WATERS mittels eines Gradienten von 80 % A (0,05 % TFA in Wasser, V/V) nach 90 % B (0,05 % TFA in Acetonitril, V/V) in 17 Minuten aufgetrennt.

NMR-Spektroskopie: ^1H -NMR-Spektren wurden mit Hilfe eines Spektrometers des Typs AMX 400 (400 MHz) bzw. DRX 500 (500 MHz) der Firma BRUKER (Rheinstetten, D) aufgezeichnet. Zur Steuerung diente die Software XWINNMR-v3 (BRUKER) und zur Auswertung die Software Mnova der Firma MESTRELAB RESEARCH (Santiago de Compostela, Esp). Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm, wobei zur Kalibrierung das jeweilige Lösungsmittelsignale (DMSO: 2.5 ppm und H_2O : 4.7 ppm) gedient hat.^[149] Die Spektren sind nach 1. Ordnung ausgewertet worden und es finden folgende Abkürzungen Verwendung: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten J werden in Hertz (Hz) angegeben.

UV/Vis-Spektroskopie: Die UV/Vis-Spektren wurden mit einem Zweistrahlenspektrometer des Typs Lambda 19 der Firma PERKIN ELMER aufgenommen und mit der Software UV-WinLab (Version 2.70.01, PERKIN ELMER) ausgewertet. Die Schichtdicke der Quarz Suprasil[®] Küvetten 114 QS der Firma HELMMA (Jena, D) betrug 1 cm. Die Probenkonzentrationen wurden so gewählt, dass die gemessene Absorption zwischen 0,1 und 1,0 Absorptionseinheiten lag. Alle Proben wurden bei Raumtemperatur vermessen.

Die optische Dichte und UV/Vis-Spektren von biologischen Proben wurden teilweise mit einem Spektrometer des Typs Ultrospec 6300 pro der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES (Freiburg, D) gemessen. Auch hier erfolgte das Messen der Absorption in einem Bereich von 0,1 bis 1,0 Absorptionseinheiten.

IR-Spektroskopie: Die IR-Spektren wurden mit dem Gerät Nicolett 5700 FT-IR der Firma THERMO ELECTRON CORPORATION (Waltham, USA) aufgenommen. Es wurden ausschließlich Feststoffe in Form von Kaliumbromidpresslingen (1 % m/m) vermessen.

CD-Spektroskopie: Der Effekt des Circular dichroismus ist definiert als die Absorptionsdifferenz zwischen links und rechts circular polarisiertem Licht:

$$\Delta A = A_l - A_r = \epsilon_l \cdot c \cdot d - \epsilon_r \cdot c \cdot d = \Delta \epsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Dabei ist d die Schichtdicke, c die Konzentration und ε der Extinktionskoeffizient. CD-Spektren werden allerdings im Allgemeinen als Elliptizität θ und nicht als $\Delta\varepsilon$ angegeben. Zur Umrechnung bedient man sich der folgenden Formel, wobei der Faktor 32,98 u. a. die Umrechnung von Bogenmaß in Grad berücksichtigt:

$$\theta(\text{deg}) = \frac{180 \cdot \ln 10 \cdot \Delta A}{4\pi} = 32,98 \cdot \Delta A \quad (2)$$

Zudem wird der Begriff der molaren Elliptizität $[\theta]$ benutzt.

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \theta}{c \cdot d} = 3298 \cdot \Delta\varepsilon \quad (3)$$

Der in Formel (3) verwendete Faktor 100 ist notwendig, um die aus historischen Gründen verwendete Einheit dmol aus mmol zu erhalten.

Durch Division der molaren Elliptizität $[\theta]$ durch die Anzahl n der Aminosäuren erhält man die Elliptizität pro Aminosäure $[\theta]_R$ mit der Einheit $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$.

$$[\theta]_R = \frac{[\theta]}{n} \quad (4)$$

Die Spektren dieser Arbeit sind als Elliptizität pro Aminosäure $[\theta]_R$ *versus* Wellenlänge dargestellt.

Für die CD-Spektroskopie wurde ein Spektropolarimeter J-175 der Firma JASCO (Groß-Umstadt, D) mit Power Supply PS-150J und einem Peltier-Element PFD-350S zum Temperieren der Küvette verwendet. Zur Aufnahme der Spektren wurden spektralvermessene Quarz Suprasil® Küvetten 110 QS der Firma HELMA mit einer Schichtdicke von 0,1 cm verwendet. Die zu vermessenden Proteine wurden auf eine Endmassenkonzentration von $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ mit $1 \times \text{PBS}$ verdünnt und anschließend wurden bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ jeweils vier Scans im Bereich von $200 - 250 \text{ nm}$ mit einer Geschwindigkeit von 50 nm min^{-1} durchgeführt. Dabei betrug die Bandweite $1,0 \text{ nm}$ und die Integrationszeit (Response) 1 Sekunde. Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit der Software Spectra-Manager für Windows 95/NT Version 1.53.00 der Firma JASCO.

Außerdem wurden auch thermische Entfaltungskurven aufgenommen. Dazu wurden die Proben der CD-Spektroskopie in den gleichen Küvetten und im gleichen Gerät von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Geschwindigkeit von $30 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$ erwärmt und dabei die Änderung der Elliptizität bei 220 nm verfolgt. Die Bandweite betrug wiederum $1,0 \text{ nm}$, die Response 16 s . Mit Hilfe der thermischen Entfaltungskurve können der prozentuale Anteil an gefaltetem und ungefaltetem Protein sowie der Schmelzpunkt des Proteins bestimmt werden. Definitionsgemäß liegen am Schmelzpunkt 50% des Proteins ungefaltet vor.

Bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ und nach dem Abkühlen unter den gleichen Parametern auf $4 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden zur

Bestätigung der Rückfaltung CD-Spektren aufgenommen.

Fluoreszenzspektroskopie: Fluoreszenzspektren wurden an einem Luminescence Spectrometer LS 50 B der Firma PERKINELMER LIFE SCIENCES (Boston MA, USA) durchgeführt, wobei der Anregungs- und der Emissionsslit jeweils 5 nm betrug. Zur Bestimmung der Fluoreszenz wurden Quarz Suprasil[®] Küvetten 108F QS der Firma HELIMA mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Proteinlösung lag in einer Konzentration von 5 μM vor und wurde mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm angeregt. Die Fluoreszenz wurde in einem Bereich von 300 – 500 nm bei 20 °C aufgenommen.

Chromatographie: Die Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60 Fertigplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma MERCK verfolgt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch UV-Absorption bei 254 nm und durch Färbung mittels Besprühen mit den gängigen Reagenzien und anschließender Schwärzung mit einem Heißluftgebläse. Die präparative Säulenchromatographie erfolgte auf Kieselgel 60 (230 – 400 mesh) der Firma MERCK. Die verwendeten Lösungsmittelgemische werden bei den einzelnen Darstellungen erwähnt.

Gefriertrocknung: Es wurde eine Gefriertrocknungsanlage des Modells Alpha 2-4 der Firma CHRIST (Osterode, D) verwendet. Als Lösungsmittel wurden Wasser oder wässrige Lösungen von Acetonitril, Methanol und Essigsäure verwendet. Die Trocknung erfolgte bei 0,05 mbar und -45 °C.

Autoklav:	Autoklav 23 (MELAG MEDIZINTECHNIK, Berlin, D) Varioklav (H+P LABORTECHNIK GMBH, Oberschleißheim, D)
Electroporator:	Electroporator 1000 (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA)
Elektrophoreseapparatur:	Eigenbau MPI für Biochemie
Geldokumentation:	Eagle Eye II (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA) High Performance CCD Camera (COHU, INC., San Diego, CA, USA)
PCR-Maschine:	Robocycler gradient 96 (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA)
Sonifier:	Sonifier 250 (BRANSON, Danbury, CT, USA) Sonifier 450 (BRANSON, Danbury, CT, USA)
Sterilbank:	Lamin Air HB 2448 compact GS (HERAEUS, Hanau, D)

Vortex:	Vortex-genie 2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES, Bohemia, NY, USA)
Zentrifugen:	Avanti J-25 Centrifuge (BECKMANN, München, D) Avanti J-20 XP Centrifuge (BECKMANN, München, D) Optima LE-80K Ultracentrifuge (BECKMANN, München, D) Centrifuge 3200 (EPPENDORF, Hamburg, D) Centrifuge 5415 D (EPPENDORF, Hamburg, D) Centrifuge 5415 C (EPPENDORF, Hamburg, D) Minifuge 5417 R (EPPENDORF, Hamburg, D) Universal 32 R (ANDREAS HETTICH GMBH, Tuttlingen, D) Rotanta 460 R (ANDREAS HETTICH GMBH, Tuttlingen, D) Labofuge A (HERAEUS CHRIST GMBH, Osterode, D) Minifuge RF (HERAEUS SEPATECH GMBH, Hanau, D)
Zentrifugenrotoren:	JLA 8.1000 (BECKMANN, München, D) JA 10 (BECKMANN, München, D) JA 20 (BECKMANN, München, D) JA 25.50 (BECKMANN, München, D) JVA 10.500 (BECKMANN, München, D) 45 TI (BECKMANN, München, D) 60 TI (BECKMANN, München, D) 5624 (ANDREAS HETTICH GMBH, Tuttlingen, D) 1619 (ANDREAS HETTICH GMBH, Tuttlingen, D)

4.2 Allgemeine chemische Arbeitsvorschriften

Bestimmung des ee-Wertes von Aminosäuren

Die Bestimmung des ee-Wertes von Aminosäuren wurde analog der Vorschrift von ADAMSON und Mitarbeitern durchgeführt.^[109]

Zu einer Aminosäurelösung (200 μL ; 10 mM in 0,1 M NaHCO_3) wurde N_α -(2,4-Dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamid (FDAA; 200 μL ; 10 mM in Aceton) gegeben und das Reaktionsgemisch für eine Stunde unter Schütteln auf 40 °C erwärmt. Anschließend erfolgten die Zugabe von HCl (20 μL ; 1 M) und ein analytischer RP-HPLC-Lauf (aHPLC4). Da FDAA enantiomerenrein eingesetzt wurde, entspricht der de-Wert des Reaktionsproduktes dem ee-Wert der eingesetzten Aminosäure. Unter den Analysebedingungen weist FDAA eine Retentionszeit von $t_R = 6,3$ min auf.

Einführung der Fmoc-Schutzgruppe

Für die Peptidsynthese wurde die Aminogruppe von selbstständig synthetisierten oder kommerziellen Aminosäuren, die nicht als Fmoc-Derivat erhältlich sind, nach einem literaturbekannten Protokoll mit der Fmoc-Gruppe geschützt.^[150]

Die Aminosäure (1 Äq.) und Na_2CO_3 (1 Äq.) wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{Aceton}$ (1:1, V/V) gelöst und es erfolgte die Zugabe von N -(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid (Fmoc-OSu; 1,1 Äq.), wobei der pH-Wert der Lösung 9 betragen sollte (gegebenfalls wurde mehr Na_2CO_3 zugegeben). Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Essigsäureethylester versetzt und mit Salzsäure der pH auf 1 eingestellt. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen und abschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Hexan gefällt und bei 4 °C sowie 2800 rpm (Rotor: 5624) für 10 Minuten unter Stickstoffatmosphäre abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut eingengt und die Fällung wiederholt. Das Reaktionsprodukt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Automatisierte Peptidsynthese (SPPS)

Die Synthese der Peptide erfolgte nach der Fmoc/ $t\text{Bu}$ -Schutzgruppenstrategie. Als polymere Matrix wurde das Harz TentaGel S Ram verwendet, wobei die Beladung 0,25 mmol g^{-1} betrug. Die Ansatzgröße variierte zwischen 0,1 und 0,2 mmol. Die Seitenketten der Aminosäuren wurden während der Synthese mit folgenden Gruppen geschützt: Boc (Lysin, Tryptophan), $t\text{Bu}$ (Tyrosin, Serin, Threonin), Trt (Histidin, Glutamin), Pbf (Arginin) und $Ot\text{Bu}$ (Glutaminsäure).

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20 % Piperidin (V/V) in DMF innerhalb von 5 Minuten abgespalten. Die Kupplung der einzelnen Aminosäuren erfolgte mit 4 Äq. Fmoc-

Xaa-OH, 4 Äq. HOBt, 4 Äq. HBTU und 8 Äq. DIPEA in DMF. Die Kupplungsdauer betrug jeweils 60 Minuten. Bei Bedarf wurden die Peptide mittels 5 % Acetanhydrid und 6 % Lutidin in 10 Minuten acetyliert. Als Waschlösung zwischen den einzelnen Schritten wurde NMP verwendet.

Nach der Synthese wurde das Peptid entweder mittels manueller Peptidsynthese (s. u.) verlängert oder manuell vom Harz mit 96 % Trifluoressigsäure, 2 % Triisopropylsilan und 2 % Wasser (V/V/V) abgespalten (Reaktionszeiten: 1×60 , 2×30 Minuten). Das Harz wurde abschließend dreimal mit Dichlormethan gewaschen und die Lösung am Rotationsverdampfer im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 mL kaltem Hex/MTBE (1:2, V/V) gefällt und für 20 Minuten bei 4 °C und 2800 rpm (Rotor: 5624) unter Stickstoffatmosphäre zentrifugiert. Bei Bedarf erfolgte eine Reinigung mittels präparativer RP-HPLC.

Manuelle Peptidsynthese (SPPS)

In einigen Fällen erfolgte die Kupplung der letzten Aminosäure an das harzgebundene Peptid (freier N-Terminus) manuell. Die Reaktionen liefen in Spritzen mit Filtern ab, die in einem Kreisschüttler KS 130 basic der Firma IKA (Staufen, D) fixiert waren. Eine Absaugvorrichtung diente zum Entfernen der Lösungsmittel.

Das peptidbeladene Harz wurde in die Spritze ($V = 5$ mL) überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Daraufhin wurde DMF zum Harz gegeben und ließ dieses 10 – 30 Minuten quellen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 Äq. Fmoc-Xaa-OH, 2 Äq. HOBt, 2 Äq. HBTU und 4 Äq. DIPEA. Danach wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und das Harz abschließend fünfmal mit DMF gewaschen. Dann wurde eine Testabspaltung durchgeführt (siehe unten) und bei positivem Ergebnis erfolgte die präparative Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Diese wurde mit einer Lösung aus 20 % Piperidin (V/V) in DMF durchgeführt. Nach 5 Minuten wurde die Lösung erneuert und die Abspaltung für weitere 20 Minuten fortgesetzt. Die vollständige Abspaltung wurde mit Hilfe des Kaiser-Tests (siehe unten) überprüft.^[151]

Abschließend wurde das Peptid vom Harz gespalten, indem das Harz zunächst jeweils fünfmal mit DMF, Dichlormethan und anschließend wieder mit DMF gewaschen wurde. Fortgefahren wurde dann analog zur Beschreibung bei der automatisierten Peptidsynthese.

Testabspaltung vom peptidbeladenen Harz

Zur Überprüfung der vollständigen Kupplung wurden Testabspaltungen durchgeführt. Hierzu wurden einige Harzkugeln mit Wasser (4 μ L), Triisopropylsilan (4 μ L) und TFA (192 μ L) versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung in kaltem MTBE (600 μ L) gefällt und 5 Minuten bei 13000 rpm (Zentrifuge: 5415 C) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, der Rückstand erneut in

kaltem MTBE (600 μ L) resuspendiert und die Suspension zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde der Rückstand in Wasser/Acetonitril (1:1, V/V) aufgenommen und massenspektrometrisch analysiert.

Kaiser-Test

Die Vollständigkeit der Fmoc-Abspaltung oder eines Kupplungsschrittes kann mit Hilfe des Kaiser-Tests überprüft werden.^[151] Zur Durchführung des Tests wurden einige Harzkugeln mit jeweils 20 μ L folgender Lösungen versetzt:

Lösung I: 1,0 g Ninhydrin in 20 mL Ethanol

Lösung II: 80 g Phenol in 20 mL Ethanol

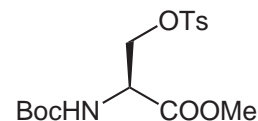
Lösung III: 0,4 mL einer 1 mM wässrigen KCN-Lösung in 19,6 mL Pyridin

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Thermostaten für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Eine tiefe Blaufärbung zeigt eine erfolgreiche Fmoc-Abspaltung bzw. eine unvollständige Kupplung an, während eine schwach gelbliche Lösung eine unvollständige Fmoc-Abspaltung bzw. eine erfolgreiche Kupplung bestätigt. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Vollständigkeit der Kupplung durch den Kaiser-Test nur bei primären Amininen erfolgen kann.

4.3 Synthesen

Boc-Ser(OTs)-OMe (14)

Im Eisbad wurde unter Argonatmosphäre TsCl (0,85 g; 4,47 mmol) in Pyridin (10 mL) gelöst, mit Boc-Ser-OMe (**13**; 1 g; 4,56 mmol) in Pyridin (4 mL) versetzt und die Lösung anschließend drei Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Erreichen der Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von HCl (1 M; 100 mL) unter Eiskühlung. Daraufhin wurde



die Lösung dreimal mit Essigsäureethylester (jeweils 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils zweimal mit HCl (1 M; jeweils 100 mL), NaHCO₃ (ges.; jeweils 100 mL) und Wasser (jeweils 100 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Abschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (cHex/EE = 3:1, V/V) gereinigt. Es resultierte ein farbloses Öl, das bei Raumtemperatur auskristallisierte, in einer Ausbeute von 55 % (936 mg, 2,51 mmol).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, SO₂-C-CH, SO₂-C-CH'), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₃-C-CH, CH₃-C-CH'), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.36 – 4.35 (m, 1H, NH-CH), 4.18 (m, 2H, SO₂-O-CH₂), 3.58 (s, 3H, CO-O-CH₃), 2.43 (s, 3H, CH-C-CH₃), 1.35 (s, 9H, O-C₄H₉) ppm.

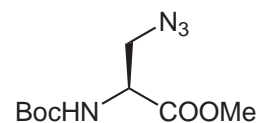
ESI-MS: *m/z* = 274.2 (100 %) [M – Boc + H⁺], 318.0 (41 %) [M – C₄H₈ + H⁺] amu. Berechnet für C₁₆H₂₃NO₇S: *M*_{mono} = 373.12 g mol⁻¹.

aHPLC2: *t*_R = 13,64 min.

*R*_f = 0,32 (cHex/EE = 3:1, V/V).

Boc-Aza-OMe (15)

Zu Boc-Ser(OTs)-OMe (**14**; 459 mg; 1,23 mmol) in Chloroform (20 mL) wurde *N,N,N',N'*-Tetramethylguanidiniumazid (486 mg; 3,08 mmol) gegeben und bei 65 °C über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EE = 4:1, V/V). Es resultierte ein farbloses Öl in einer Ausbeute von 40 % (120 mg; 0,49 mmol).



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 7,51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.26 – 4.21 (m, 1H, NH-CH), 3.65 (s, 3H, CO-O-CH₃), 3.59 – 3.54 (m, 2H, N₃-CH₂), 1.39 (s, 9H, O-C₄H₉) ppm.

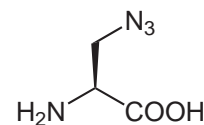
ESI-MS: *m/z* = 145.0 (100 %) [M – Boc + H⁺], 189.0 (71 %) [M – C₄H₈ + H⁺], 245.2 (40 %) [M + H⁺] amu. Berechnet für C₉H₁₆N₄O₄: *M*_{mono} = 244.12 g mol⁻¹.

aHPLC2: *t*_R = 10,75 min.

*R*_f = 0,35 (cHex/EE = 4:1, V/V).

L-Azidoalanin (Aza, 12, chemisch)

Boc-Aza-OMe (**15**; 366 mg; 1,5 mmol) wurde in HCl (6 M; 15 mL) gelöst und die Lösung für 5 Stunden bei 110 °C gerührt. Anschließend wurde unter Eiskühlung mit Natronlauge neutralisiert und die Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde in HCl (1 M) aufgenommen und mittels Kationenaustauscher (Dowex 50WX8, 50 – 100 mesh, H⁺-Form) gereinigt. Dazu wurde die Säule nach dem Auftragen der Probe mit Wasser (500 mL) salzfrei gewaschen. Anschließend wurde mit Ammoniak (2 M) eluiert und die Lösung lyophilisiert. Es verblieb ein weißer Feststoff in einer Ausbeute von 50 % (98 mg; 0,75 mmol)



¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 300 K): $\delta = 3.80 - 3.67$ (m, 2H, N₃-CH₂), 3.76 – 3.73 (m, 1H, CO-CH) ppm. Die Amino- und die Carboxylgruppe liegen in D₂O deuteriert vor.

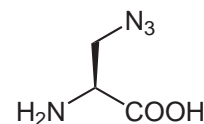
ESI-MS: $m/z = 131.0$ (100 %) [M + H⁺], 261.2 (31 %) [2 × M + H⁺] amu. Berechnet für C₃H₆N₄O₂: $M_{mono} = 130.05$ g mol⁻¹.

ee-Wert (aHPLC4): 100 % ($t_R = 11,60$ min).

IR: $\nu = 3074, 2112, 1599$ cm⁻¹.

L-Azidoalanin (Aza, 12, enzymatisch)

O-Acetyl-L-serin-hydrochlorid (**19**; 100 mg; 0,53 mmol) und Natriumazid (100 mg; 1,54 mmol) wurden in Natriumphosphatpuffer (0,2 M, pH = 7) gelöst und die Lösung mit Hilfe von Argon entgast. Anschließend erfolgte die Zugabe von rOASS-A (3 mg mL⁻¹, 400 μ L). Das Reaktionsgefäß wurde lichtdicht verpackt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend wurde das Enzym mit Hilfe von Vivaspin 20 (MWCO = 30000) Zentrifugenröhrchen SARTORIUS, Göttingen, D) abgetrennt (35 Minuten; 4 °C; 4000 rpm (Rotor: 1019)) und die verbleibende Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde mittels Kationenaustauscher (siehe oben) aufgereinigt. Das entstandene Eluat wurde lyophilisiert und es verblieb L-Azidoalanin als weißes Pulver in einer Ausbeute von 90 % (62 mg; 0,48 mmol).



¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 300 K): $\delta = 3.95 - 3.80$ (m, 2H, N₃-CH₂), 3.88 – 3.87 (m, 1H, CO-CH) ppm. Die Amino- und die Carboxylgruppe liegen in D₂O deuteriert vor.

ESI-MS: $m/z = 130.8$ (100 %) [M + H⁺], 105.8 (26 %) [M – N₂ + H⁺] amu. Berechnet für C₃H₆N₄O₂: $M_{mono} = 130.05$ g mol⁻¹.

ee-Wert (aHPLC4): 100 % ($t_R = 11,29$ min).

IR: $\nu = 3073, 2112$ cm⁻¹.

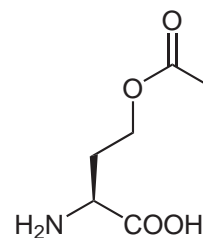
O-Acetylhomoserin (24)

Die Synthese von **24** erfolgte nach der Vorschrift von NAGAI und FLAVIN.^[110]

Zu Eisessig (99,9%ig; 20 mL) wurde Perchlorsäure (60%ig; 1,7 mL) gegeben. Unter vorsichtiger Kühlung (Lösung erstarrt bei 14 °C) wurde die Lösung mit Essigsäureanhydrid (99,9%ig; 8,1 mL) versetzt. Anschließend wurde L-Homoserin (**23**; 1 g; 8,4 mmol) in Eisessig (99,9%ig; 10 mL) gelöst und bei Raumtemperatur langsam zur Reaktionslösung gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin erfolgten die Zugabe von Wasser (0,22 mL) und die Neutralisation der Lösung mit Pentylamin (2 mL; 18 mmol) sowie die Zugabe von 300 mL Diethylether. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 5 °C gelagert und am nächsten Tag mit weiteren 150 mL Diethylether versetzt und dann für mehrere Stunden bei -20 °C gelagert. Daraufhin wurde die Lösung filtriert, der Überstand verworfen und der Rückstand im Exsikkator getrocknet. Das Rohprodukt (1,16 g) wurde in Wasser (15 mL) gelöst und filtriert. Das Filtrat wurde mit Ethanol (100 mL) versetzt und über Nacht bei 0 °C gelagert, woraufhin **24** in farblosen Nadeln kristallisierte. Die Ausbeute betrug 15 % (200 mg; 1,2 mmol).

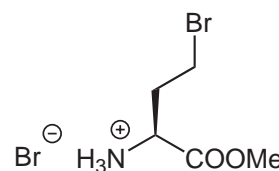
¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 300 K): δ = 3.40 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH₂-CH₂-O), 3,51 (dd, J = 6.74 Hz, 5.80 Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.98 – 1.83 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 1.76 (s, 3H, O-CO-CH₃) ppm. Die Amino- und die Carboxylgruppe liegen in D₂O deuteriert vor.

ESI-MS: m/z = 162.4 (100 %) [M + H⁺] amu. Berechnet für C₆H₁₁NO₄: M_{mono} = 160.07 g mol⁻¹.

**(S)-(+)-2-Amino-4-brombuttersäuremethylester (26)**

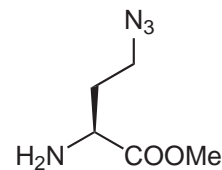
(S)-(+)-2-Amino-4-brombuttersäure (**25**; 5 g; 19 mmol) wurde in Methanol (75 mL) gelöst und mit HBr (48%ig; 5 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei einer Ölbadtemperatur von 73 °C unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und die Lösung lyophilisiert. Es verblieb das Reaktionsprodukt als bräunlicher Feststoff in 90 % Ausbeute (4,75 g, 17,1 mmol). **26** wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

ESI-MS: m/z = 136.0/138.0 (90 %) [M – HBr – COOCH₃]⁺, 196.0/198.0 [M – Br⁻] amu. Berechnet für C₅H₁₁Br₂NO₂: M_{mono} = 274.92 g mol⁻¹.



(S)-(+)-2-Amino-4-azidobuttersäuremethylester (27)

(S)-(+)-2-Amino-4-brombuttersäuremethylester (**26**; 2,27 g; 8,2 mmol) wurden in wasserfreiem Chloroform (30 mL) gelöst und mit *N,N,N',N'*-Tetramethylguanidiniumazid (5 g, 32 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei einer Ölbadtemperatur von 65 °C unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit EE → EE/EtOH (9:1, V/V) als fluide Phase gereinigt. Es resultierte **27** als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 83 % (1,07 g; 6,8 mmol).

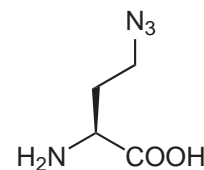


ESI-MS: $m/z = 159.2$ (65 %) [$M + H^+$], 317.2 (100 %) [$2 \times M + H^+$] amu. Berechnet für $C_6H_{10}N_4O_2$: $M_{mono} = 158.08$ g mol⁻¹.

R_f: = 0,28 (EE)

L-Azidohomoalanin (10)

(S)-(+)-2-Amino-4-azidobuttersäuremethylester (**27**; 2,8 g; 17,7 mmol) wurde in einer Mischung aus H₂O/THF (2:3, V/V) gelöst und mit Natriumhydroxid (78 mg; 19,5 mmol) versetzt. Die Lösung wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Salzsäure neutralisiert. Daraufhin wurde die Lösung lyophilisiert und der Rückstand in HCl (1 M) aufgenommen und über einen Kationenaustauscher (Dowex 50WX8, 50 – 100 mesh, H⁺-Form) gereinigt. Dazu wurde die Säule nach dem Auftragen der Probe mit Wasser (500 mL) salzfrei gewaschen und abschließend mit Ammoniaklösung (2 M) eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert und es verblieb L-Azidohomoalanin (**10**) als hellgelbes Pulver in einer Ausbeute von 80 % (2,03g; 14,1 mmol).



¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 300 K): $\delta = 3.79$ (dd, $J = 5.6$ Hz, 6.8 Hz, 1H, CH-CH₂-CH₂), 3.57 – 3.53 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂), 2.17 – 1.99 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂) ppm. Die Amino- und die Carboxylgruppe liegen in D₂O deuteriert vor.

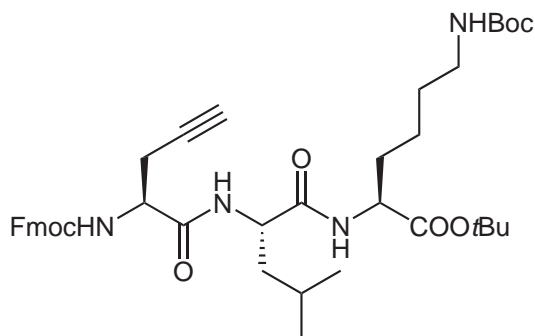
ESI-MS: $m/z = 145.0$ (100 %) [$M + H^+$], 289.0 (45 %) [$2 \times M + H^+$] amu. Berechnet für $C_4H_8N_4O_2$: $M_{mono} = 144.06$ g mol⁻¹.

ee-Wert (aHPLC4): 91 % ($t_R = 14,73$ min (L-Aha) und $t_R = 17,80$ min (D-Aha)).

IR: $\nu = 2119, 1587, 1507$ cm⁻¹.

Fmoc-Pra-Leu-Lys(Boc)-OtBu (29)

H-Leu-Lys(Boc)-OtBu (**28**; 270 mg; 0,65 mmol) wurde bei Raumtemperatur in DMF (20 mL) gelöst und mit Fmoc-Pra-OH (200 mg; 0,6 mmol), EDCI (230 mg; 1,2 mmol) sowie HOBT (162 mg; 1,2 mmol) versetzt, woraufhin die Zugabe von DIPEA (206 μ L, 12 mmol) erfolgte. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach acht Stunden wurde erneut DIPEA (103 μ L, 6 mmol) zur Reaktionslösung gegeben und über Nacht weitergerührt. Anschließend

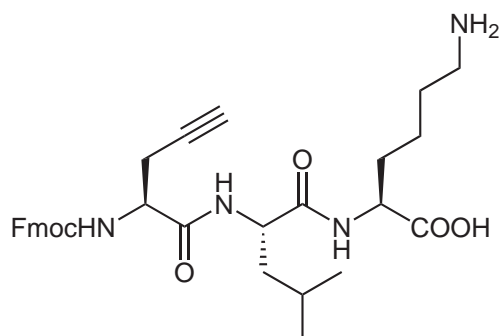


wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Essigsäureethylester (20 mL) aufgenommen und die organische Phase jeweils dreimal mit 5%iger (m/V) KHSO_4 -Lösung (jeweils 20 mL), 5%iger (m/V) NaHCO_3 -Lösung (jeweils 20 mL) und NaCl -Lösung (ges.; jeweils 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit einem Gemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (20:15, V/V) als fluider Phase gereinigt. Es verblieb **29** als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 60 % (287 mg; 0,45 mmol).

ESI-MS: $m/z = 633.6$ (95 %) $[\text{M} - \text{Boc} + \text{H}^+]$, 733.8 (100 %) $[\text{M} + \text{H}^+]$ amu. Berechnet für $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_8$: $M_{\text{mono}} = 732.40 \text{ g mol}^{-1}$.

Fmoc-Pra-Leu-Lys-OH (30)

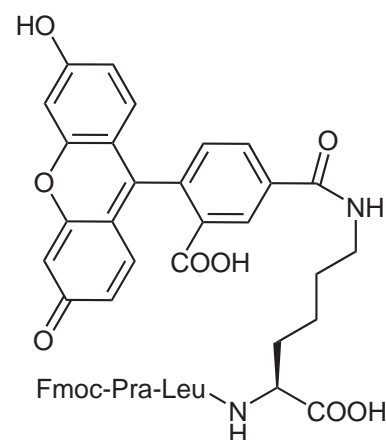
Fmoc-Pra-Leu-Lys(Boc)-OtBu (**29**; 240 mg; 0,33 mmol) wurde in TFA (5 mL) gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde TFA im Vakuum entfernt und mit Toluol (5 mL) nachdestilliert. Es verblieb ein weißer Feststoff, der in cHex/MTBE (1:1, V/V) suspendiert wurde. Die Suspension wurde filtriert, der Rückstand mit cHex/MTBE (1:1 V/V) gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Es resultierte **30** als Trifluoracetat in einer Ausbeute von 80 % (180 mg; 0,26 mmol).



ESI-MS: $m/z = 577.4$ (100 %) $[\text{M} + \text{H}^+]$. Berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_6$: $M_{\text{mono}} = 576.29 \text{ g mol}^{-1}$.

Fmoc-Pra-Leu-Lys(CF1)-OH (32)

Fmoc-Pra-Leu-Lys-OH (**30**; 1,5 mg; 2,1 μmol) wurde in DMF (5 mL) gelöst und mit 5-Carboxyfluorescein-*N*-succinimidylester (**31**; 1 mg; 2,1 μmol) sowie DIPEA (5 μL ; 30 μmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in BuOH/EE (1:1, V/V; 20 mL) aufgenommen und einmal mit Wasser (20 mL) gewaschen. Nach der Phasentrennung wurden die organischen Lösungsmittel im Vakuum entfernt und es verblieb **32** als gelbes Öl. Die Ausbeute wurde anhand des UV/Vis-Spektrums der LC-MS-Analyse auf 90 % (1,8 mg; 1,9 μmol) geschätzt.



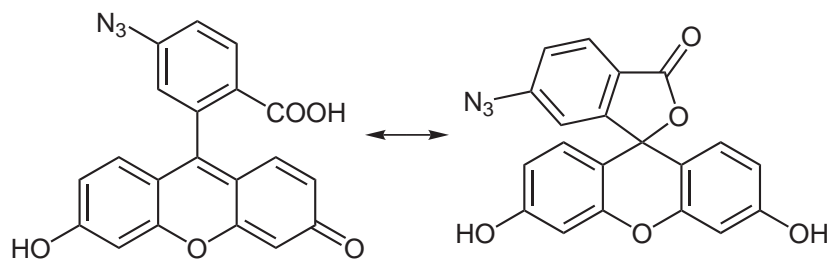
ESI-MS: $m/z = 935.4$ (100 %) $[M + H^+]$. Berechnet für $C_{53}H_{50}N_4O_{12}$: $M_{mono} = 934.34$ g mol^{-1} .

LC-MS: $t_R = 11.75$ min.

6-Azidofluorescein (34)

Die Darstellung von **34** erfolgte analog zur Vorschrift zur Synthese von 7-Azido-4-methylcoumarin von CHEN *et al.*^[113]

Zu einer Lösung aus 6-Aminofluorescein (500 mg; 1,4 mmol) in konzentrierter



Salzsäure (20 mL) wurde bei 4 °C NaNO_2 -Lösung (25%ig, V/V; 1,8 mL) gegeben, wobei sich die Lösung von Gelbgrün nach Orange färbte, und für 20 Minuten gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von NaN_3 -Lösung (20%ig, m/V; 2,2 mL) bei 0 °C. Die Lösung wird für 48 Stunden bei 0 °C gerührt. Die intensiv gelb gefärbte Lösung wurde mittels Natronlauge neutralisiert, wobei sich eine Rotfärbung einstellte. Anschließend wurde die Lösung mit einem Gemisch aus BuOH/EE (1:1, V/V) extrahiert (dreimal; jeweils 40 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es verblieb 6-Azidofluorescein (**34**) als roter Feststoff in einer Ausbeute von 75 % (400 mg; 1,1 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , 300 K): $\delta = 10.35$ (s, 2H, COH-CH-CH-C, C'OH-C'H-

C'H-C'), 7.99 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, N₃-C-CH-CH), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, N₃-C-CH-CH), 7.01 (s, 1H, N₃-C-CH-C), 6.62 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, COH-CH-CH-C, C'OH-C'H-C'H-C'), 6.59 (s, 2H, COH-CH-C, C'OH-C'H-C'), 6.52 (d, $J = 7.9$, 2H, COH-CH-CH-C, C'OH-C'H-C'H-C) ppm. Die Zuordnung der Protonen erfolgte in diesem Fall durch Vergleich mit dem Edukt^[152] und Berechnungen mittels ChemDraw Ultra 8.

ESI-MS: $m/z = 346.2$ (90 %) $[M - N_2 + H^+]$, 374.0 (100 %) $[M + H^+]$. Berechnet für C₂₀H₁₁N₃O₅: $M_{mono} = 373.07$ g mol⁻¹.

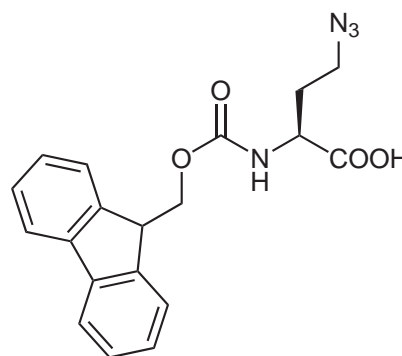
Fmoc-Aha-OH

Die Synthese erfolgte nach dem in 4.2 beschriebenen Protokoll. Es resultierte das Reaktionsprodukt in 60 % Ausbeute.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 300 K): $\delta = 12.74$ (s, 1H, COOH), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH-CH-C-C', C-C'-CH-CH), 7.72 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH-CH-C-CH, C'H-C'H-C'-CH), 7.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, O-CO-NH-CH), 7.42 (dd, $J = 7.6$ Hz, 7.2 Hz, 2H, CH-CH-C-C', C-C'-CH-CH), 7.33 (dd, $J = 7.2$ Hz, 7.2 Hz, 2H, CH-CH-C-CH, C'H-C'H-C'-CH), 4.32 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH-CH₂-O-CO), 4.23 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CH-CH₂-O-CO), 4.05 (m, 1H, O-CO-NH-CH), 3.45 – 3.34 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.97 – 1.84 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂) ppm.

ESI-MS: $m/z = 179.0$ (100 %) $[M - C_5H_7N_4O_4]^+$, 367.2 (60 %) $[M + H^+]$, 733.6 (45 %) $[2 \times M + H^+]$ amu. Berechnet für C₁₉H₁₈N₄O₄: $M_{mono} = 366.13$ g mol⁻¹.

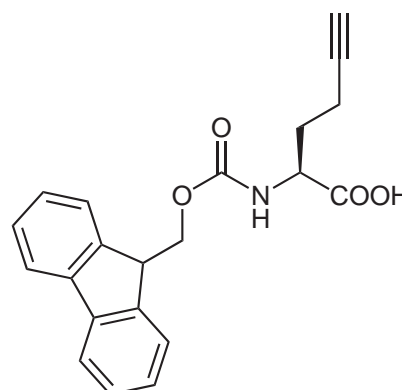
aHPLC2: $t_R = 13,4$ min.



Fmoc-Hpg-OH

Die Synthese erfolgte nach dem in 4.2 beschriebenen Protokoll. Es resultierte das Reaktionsprodukt in 90 % Ausbeute.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 300 K): $\delta = 12.65$ (s, 1H, COOH), 7.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH-CH-C-C', C-C'-CH-CH), 7.72 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH-CH-C-CH, C'H-C'H-C'-CH), 7.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, O-CO-NH-CH), 7.42 (dd, $J = 7.6$ Hz, 7.2 Hz, 2H, CH-CH-C-C', C-C'-CH-CH), 7.33 (dd, $J = 7.6$ Hz, 7.2 Hz, 2H, CH-CH-C-CH,



C'H-C'H-C'-CH), 4.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH-CH₂-O-CO), 4.23 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, CH-CH₂-O-CO), 4.07 (m, 1H, O-CO-NH-CH), 2.81 (s, 1H CH₂-C≡CH), 2.24 (m, 1H, CH-CH₂-CH₂), 1.90 – 1.71 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂) ppm.

ESI-MS: $m/z = 179.0$ (100 %) $[M - C_7H_8NO_4]^+$, 350.0 (55 %) $[M + H^+]$, 699.4 (40 %) $[2 \times M + H^+]$ amu. Berechnet für C₂₁H₁₉NO₄: $M_{mono} = 349.13$ g mol⁻¹.

aHPLC2: $t_R = 13,3$ min.

Fmoc-Nle-OH

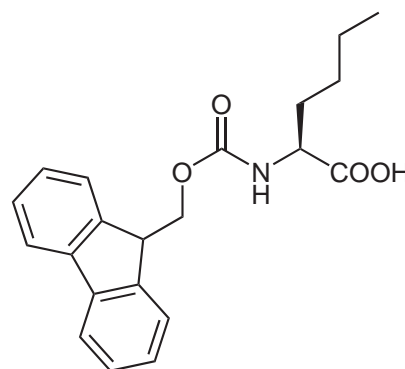
Die Synthese erfolgte nach dem in 4.2 beschriebenen Protokoll. Es resultierte das Reaktionsprodukt in 80 % Ausbeute.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 300 K): $\delta = 12.52$ (s, 1H, COOH), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH-CH-C-C', C-C'-CH-CH), 7.73 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH-CH-C-CH, C'H-C'H-C'-CH), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, O-CO-NH-CH), 7.42 (dd, $J = 7.5$ Hz, 7.4 Hz, 2H, CH-CH-C-C', C-C'-CH-CH), 7.33 (dd, $J = 7.4$ Hz, 7.3 Hz, 2H, CH-CH-C-CH, C'H-C'H-C'-CH), 4.29 – 4.21 (m, 3H, CH-CH₂-O-CO),

3.92 (m, 1H, O-CO-NH-CH), 1.75 – 1.55 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.35 – 1.19 (m, 4H, CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 0.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃) ppm.

ESI-MS: $m/z = 179.2$ (100 %) $[M - C_7H_12NO_4]^+$, 354.4 (95 %) $[M + H^+]$ amu. Berechnet für C₂₁H₂₃NO₄: $M_{mono} = 353.16$ g mol⁻¹.

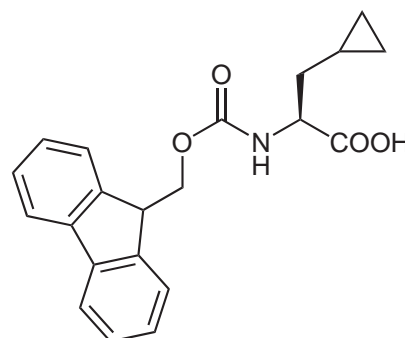
aHPLC3: $t_R = 11,6$ min.



Fmoc-Cpa-OH

Die Synthese erfolgte nach dem in 4.2 beschriebenen Protokoll. Es resultierte das Reaktionsprodukt in 55 % Ausbeute.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 300 K): $\delta = 7.89$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH-CH-C-C', C-C'-CH-CH), 7.73 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH-CH-C-CH, C'H-C'H-C'-CH), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, O-CO-NH-CH), 7.42 (dd, $J = 7.5$ Hz, 7.4 Hz, 2H, CH-CH-C-C', C-C'-CH-CH), 7.33 (dd, $J = 7.4$ Hz, 7.3 Hz, 2H, CH-CH-C-CH, C'H-C'H-C'-CH), 4.39 –



4.19 (m, 3H, CH-CH₂-O-CO), 3.98 (m, 1H, O-CO-NH-CH), 1.69 – 1.42 (m, 2H, CH-CH₂-CH(C₂H₄)), 0.78 (m, 1H, CH-CH₂-CH(C₂H₄)), 0.45 – 0.35 und 0.19 – 0.01 (m, 4H, CH-CH₂-CH(C₂H₄)) ppm.

ESI-MS: $m/z = 179.2$ (100 %) $[M - C_7H_{10}NO_4]^+$, 352.4 (90 %) $[M + H^+]$ amu. Berechnet für C₂₁H₂₁NO₄: $M_{mono} = 351.15$ g mol⁻¹.

aHPLC3: $t_R = 11,4$ min.

4.4 Peptidsynthesen

Synthese des CSF114(Glc)-analogen Peptids (13)

Die Synthese erfolgte nach der in 4.2 beschriebenen Vorgehensweise für die automatisierte Peptidsynthese.

Sequenz: Ac-Thr-Pro-Arg-Val-Glu-Arg-Pra-Gly-His-Ser-Val-Phe-Leu-Ala-Pro-Tyr-Gly-Trp-Met-Val-Lys-NH₂

Ansatz: 0,1 mmol.

Harzbelegung: 0,250 mmol g⁻¹.

Ausbeute: Rohprodukt: 80 % (0,08 mmol), gereinigt: 35 % (0,035 mmol).

pHPLC: $t_R = 59.0$ min.

aHPLC1: $t_R = 8,6$ min.

aHPLC2: $t_R = 9.5$ min.

ESI-MS: $m/z = 617.4$ (45 %) $[M + 4H^+]$, 823.2 (100 %) $[M + 3H^+]$, 1234.4 (60 %) $[M + 2H^+]$ amu. Berechnet für C₁₁₅H₁₇₂N₃₂O₂₇S: $M_{mono} = 2465.28$ g mol⁻¹, $M_{average} = 2466.86$ g mol⁻¹.

Synthese der ψ -hEGF-analogen Peptide

Die Synthese der Peptide H-Gly-Asn-Leu-Phe-NH₂ und H-Arg-Asn-Leu-Phe-NH₂ erfolgte nach der in 4.2 beschriebenen Vorgehensweise für die automatisierte Peptidsynthese. Anschließend wurde das Harz aufgeteilt und das Peptid entweder manuell abgespalten oder mit einer weiteren Aminosäure manuell gekuppelt (siehe 4.2) und dann abgespalten. Es erfolgte keine Reinigung der Rohprodukte mittels präparativer HPLC.

Ansatz: 0,1 mmol.

Harzbelegung: 0,250 mmol g⁻¹.

Ausbeute: 50 – 90 %.

Sequenz	t_R / min aHPLC2	$M_{mono,ber}$ / g mol ⁻¹	m_{gef} / amu für [M + H ⁺]
H-Gly-Asn-Leu-Phe-NH ₂	7,9	448.2	4419.4
H-Met-Gly-Asn-Leu-Phe-NH ₂	8,8	579.3	580.4
H-Aha-Gly-Asn-Leu-Phe-NH ₂	8.6	574.3	575.4
H-Hpg-Gly-Asn-Leu-Phe-NH ₂	8.7	557.3	558.2
H-Arg-Asn-Leu-Phe-NH ₂	8.0	547.3	548.2
H-Met-Arg-Asn-Leu-Phe-NH ₂	8.9	678.4	679.6
H-Aha-Arg-Asn-Leu-Phe-NH ₂	8.7	673.4	674.6
H-Hpg-Arg-Asn-Leu-Phe-NH ₂	8.7	656.4	657.4

Synthese der eGFP-analogen Peptide

Die Synthese der Pentapeptide erfolgte nach der in 4.2 beschriebenen Vorgehensweise für die automatisierte Peptidsynthese. Anschließend wurde das Harz aufgeteilt und das Peptid entweder manuell abgespalten oder mit einer weiteren Aminosäure manuell gekuppelt (siehe 4.2) und dann abgespalten. Es erfolgte keine Reinigung der Rohprodukte mittels präparativer HPLC.

Ansatz: 0,2 mmol.

Harzbelegung: 0,250 mmol g⁻¹.

Ausbeute: 50 – 90 %.

Sequenz	t_R / min aHPLC3	$M_{mono,ber}$ / g mol ⁻¹	m_{gef} / amu für [M + H ⁺]
H-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.3	508.3	509.6
H-Met-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	8.1	639.3	640.6
H-Aha-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.6	634.3	635.8
H-Cpa-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.8	619.3	620.6
H-Nle-Gly-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	8.0	621.3	622.6
H-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.3	522.3	523.6
H-Met-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.7	653.3	654.6
H-Aha-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.6	648.3	649.8
H-Cpa-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.8	633.3	634.6
H-Nle-Ala-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	8.0	635.4	636.8

H-Arg-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.4	607.3	608.8
H-Met-Arg-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.7	738.4	739.8
H-Aha-Arg-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.5	733.4	734.8
H-Cpa-Arg-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.7	718.4	719.6
H-Nle-Arg-Ser-Ser-Leu-Phe-NH ₂	8.0	720.4	721.6
H-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.1	549.3	550.6
H-Met-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.6	680.3	681.6
H-Aha-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.5	675.3	676.8
H-Cpa-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.6	660.4	661.6
H-Nle-Gly-Gln-Ser-Leu-Phe-NH ₂	7.8	662.4	663.8

Synthese der anxA5-analogen Peptide

Die Synthese der Pentapeptide erfolgte nach der in 4.2 beschriebenen Vorgehensweise für die automatisierte Peptidsynthese. Anschließend wurde das Harz aufgeteilt und das Peptid entweder manuell abgespalten oder mit einer weiteren Aminosäure manuell gekuppelt (siehe 4.2) und dann abgespalten. Es erfolgte keine Reinigung der Rohprodukte mittels präparativer HPLC.

Ansatz: 0,2 mmol.

Harzbelegung: 0,250 mmol g⁻¹.

Ausbeute: 50 – 90 %.

Sequenz	t _R / min aHPLC3	M _{mono,ber} / g mol ⁻¹	m _{gef} / amu für [M + H ⁺]
H-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂ 4.1	592.3	593.6	
H-Met-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.4	723.4	724.6
H-Aha-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.8	718.4	719.6
H-Cpa-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	5.9	703.4	704.8
H-Nle-Gly-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.2	705.4	706.6
H-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	4.5	606.3	607.6
H-Met-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.5	737.4	738.6
H-Aha-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.8	732.4	733.8
H-Cpa-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.2	717.4	718.6
H-Nle-Ala-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.2	719.4	720.6

H-Arg-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	4.8	691.4	692.6
H-Met-Arg-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.5	822.5	823.8
H-Aha-Arg-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.7	817.5	818.6
H-Cpa-Arg-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.0	802.5	803.6
H-Nle-Arg-Gln-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.2	804.5	805.8
H-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	3.0	551.3	552.6
H-Met-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	5.8	682.3	683.6
H-Aha-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	5.5	677.4	678.8
H-Cpa-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	5.9	662.4	663.8
H-Nle-Gly-Ser-Val-Lys-Tyr-NH ₂	6.4	664.4	665.6

4.5 Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition von Peptiden

CuSO₄ und Ascorbinsäure im Überschuss

In H₂O/*t*BuOH (1:1, V/V; 600 μ L) wurden Peptid **13** (12,3 mg; 5 μ mol) und 1-Azido-1-deoxy- β -D-glucopyranosid-tetraacetat (**14a**; 1,9 mg; 5 μ mol) gelöst und mit einigen Kristallen Kupfersulfat-pentahydrat und L-Ascorbinsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 72 Stunden gerührt.

Zur Reinigung des Produktes wurden NAP-5 Säulen der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES (Uppsala, SE) verwendet, wobei das mitgelieferte Protokoll insofern abgeändert wurde, dass das Probenvolumen auf 0.25 mL reduziert wurde. Eluiert wurde mit 2 mL H₂O und die Fraktionsgröße berug jeweils 0,5 mL. Die Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC untersucht und entsprechend vereinigt. Nach der Entfernung des Wassers im Gefriertrockner verblieben 9 mg (63 %) des Produktes (Peptid **2**) als weißer Feststoff. Im ESI-MS- und aHPLC-Spektrum waren allerdings kleinere Verunreinigungen detektierbar. Daher wurden bei den folgenden Synthesen das Rohprodukt mittels pHPLC aufgereinigt.

aHPLC2: $t_R = 9.1$ min.

ESI-MS: $m/z = 711.2$ (9 %) [M + 4H⁺], 947.8 (100 %) [M + 3H⁺], 1420.6 (9 %) [M + 2H⁺] amu. Berechnet für C₁₃₀H₁₉₃N₃₅O₃₅S: $M_{mono} = 2836.4$ g mol⁻¹, $M_{average} = 2838.2$ g mol⁻¹.

CuSO₄ und Ascorbinsäure je 50 mol%

Das Peptid **13** (10 mg; 4 μmol) wurde in H₂O/*t*BuOH (1:1, V/V; 200 μL) gelöst und mit CuSO₄ × 5H₂O (0,5 mg; 2 μmol), L-Ascorbinsäure (0,35 mg; 2 μmol) sowie 1-Azido-1-deoxy- β -D-glucopyranosid (**14b**; 1 mg; 4,8 μmol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Es verblieben 25 % (2,9 mg; 1 μmol) Produkt.

pHPLC: $t_R = 57.8$ min.

aHPLC2: $t_R = 7.5$ min.

ESI-MS: $m/z = 668.8$ (15 %) [M + 4H⁺], 891.6 (100 %) [M + 3H⁺], 1337.0 (50 %) [M + 2H⁺] amu. Berechnet für C₁₂₁H₁₈₃N₃₅O₃₂S: $M_{mono} = 2670.3$ g mol⁻¹, $M_{average} = 2672.0$ g mol⁻¹.

4.6 ELISA-Tests

Die Durchführung der kompetitiven ELISA-Tests erfolgte nach literaturbekannten Protokollen.^[153] Zunächst wurde in Voruntersuchungen die optimale Verdünnung (halbgesättigt, Absorption = 0,7) bestimmt. In dieser Verdünnung wurde der Antikörper mit verschiedenen Antigenkonzentrationen inkubiert (6 Stunden bei 25 °C). Anschließend wurde die Absorption gegen die Antigenkonzentration graphisch aufgetragen.

4.7 N-terminale Methioninabspaltung – *in vitro*-Assays***In vitro*-Assays mit ψ -hEGF-analogen Peptiden und PfMetAP**

Die Durchführung der Assays erfolgte analog zur Literatur.^[129]

Das Reaktionsgemisch (100 μL) enthielt 0,2 mM CoCl₂, 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,5), 3,6 mM Peptid, 1 % (V/V) DMSO und $4,4 \times 10^{-3}$ U PfMetAP. Diese Lösung wurde bei 37 °C kräftig geschüttelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten (5, 10, 30, 60, 120, 300, 600, 1440 und 1980 Minuten) wurden 40 μL Reaktionslösung mit 10 μL HCl (1 M) versetzt und mittels aHPLC2 untersucht. Von einigen Proben wurden zusätzlich LC-MS-Analysen durchgeführt.

In vitro*-Assays mit ψ -hEGF-analogen Peptiden und *EcMetAP

Die Durchführung der Assays erfolgte analog zur Literatur.^[129]

Das Reaktionsgemisch (400 μ L) enthielt 0,2 mM CoCl₂, 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,5), 1,8 mM Peptid, 1 % (V/V) DMSO und 0,43 μ M *EcMetAP*. Diese Lösung wurde bei 37 °C kräftig geschüttelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten (10, 30, 60, 90, 120 und 240 Minuten) wurden 40 μ L Reaktionslösung mit 10 μ L HCl (1 M) versetzt und mittels aH-PLC2 untersucht. Von einigen Proben wurden zusätzlich LC-MS-Analysen durchgeführt.

In vitro*-Assays mit eGFP- und anxA5-analogen Peptiden und *EcMetAP

Die Durchführung der Assays erfolgte analog zur Literatur.^[129]

Das Reaktionsgemisch (400 μ L) enthielt 0,2 mM CoCl₂, 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,5), 3,6 mM Peptid, 1 % (V/V) DMSO und 0,43 μ M *EcMetAP*. Diese Lösung wurde bei 37 °C kräftig geschüttelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten (10, 30, 60, 90, 120 und 300 Minuten) wurden 40 μ L Reaktionslösung mit 10 μ L HCl (1 M) versetzt und mittels aH-PLC2 untersucht. Von einigen Proben wurden zusätzlich LC-MS-Analysen durchgeführt.

4.8 Puffer, Medien und allgemeine biologische Arbeitsvorschriften

Alle wässrigen Puffer und Lösungen wurden unter Verwendung von bidestilliertem H₂O (MILLIPORE, Billerica, MA, USA) hergestellt und falls erforderlich autoklaviert bzw. steril filtriert.

Fertigkits

Bei den Klonierungsarbeiten kamen folgende Kits zur Anwendung: QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN GMBH, Hilden, D), das QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN GMBH), das Qiagen[®] Plasmid Midi Kit (QIAGEN GMBH) und das JETSORB Gel Extraction Kit (GENOMED, Löhne, D).

Elektrophoretische Methoden

Tab. 13: Agarose-Gelelektrophorese

Name	Substanz	c_{end} in H ₂ O
TAE-Puffer	Tris·HCl pH = 8,0	40 mM
	Essigsäure	0,1 % (V/V)
	EDTA	1 mM
10×TBE-Puffer	Tris·HCl pH = 7.0	0,45 M
	Borsäure	0,45 M
	EDTA	10 mM
6×Probenauftragspuffer	Bromphenolblau	0,25 % (m/V)
	Xylencyanol	0,25 % (m/V)
	Glycerin	30 % (V/V)

In dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurde 1×TBE oder TAE-Puffer (80 mL) mit Agarose (0,8 g) versetzt und in einer Mikrowelle aufgekocht (zur Vermeidung von Siedeverzügen wurde alle 30 Sekunden geschüttelt). Nachdem die Lösung eine Temperatur von ungefähr 40 °C erreicht hatte, wurde Ethidiumbromid (8 μ L, 0,01 %) zugesetzt und der Gelmix in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das Gel mit 1×TBE oder TAE-Puffer überschichtet. Die zu analysierenden Proben wurden mit der entsprechenden Menge an Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich erfolgte die Auftragung eines kommerziell erhältlichen Molekulargewichtsmarkers. Die Elektrophorese erfolgte für 45 – 60 Minuten bei etwa 100 V und 60 mA. Abschließend wurde das Gel zur Dokumentation fotografiert und gegebenenfalls DNA-Banden extrahiert.

Tab. 14: SDS-PAGE

Name	Substanz	c_{end} in H ₂ O
Sammelgel	Tris·HCl pH = 6,8	125 mM
	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	5 % (V/V)
	SDS	0,1 % (m/V)
	APS	0,05 % (m/V)
	TEMED	0,17 % (V/V)

Trenngel	Tris·HCl pH = 8,8	380 mM
	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	12 % bzw. 20 % (V/V)
	SDS	0,1 % (m/V)
	APS	0,05 % (m/V)
	TEMED	0,05 % (V/V)
2×Probenauftragspuffer	Tris·HCl pH = 6,8	100 mM
	DTT	200 mM
	SDS	4 % (m/V)
	Bromphenolblau	0,2 % (m/V)
	Glycerin	20 % (V/V)
Laufpuffer	Glycin	190 mM
	Tris	25 mM
	SDS	3,5 mM
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R 250	0,1 % (m/V)
	Ethanol	25 % (V/V)
	Essigsäure	8 % (V/V)
Entfärbelösung	Ethanol	25 % (V/V)
	Essigsäure	8 % (V/V)

Die vollständig polymerisierten Gele wurden in die Gelkammern eingesetzt und die Kammern mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit dem Auftragspuffer versetzt, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Die Beladung der Gele erfolgte für Zelllysate nach der Faustregel $OD_{600} = 0,5$ entspricht 20 μL Probe bzw. von 0,3 mg mL^{-1} Proteinlösung wurden 20 μL aufgetragen. Zusätzlich wurde jeweils ein kommerziell erhältlicher Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 120 Minuten bei 130 V und 30 mA. Danach wurde das Gel in eine Schale mit Färbelösung überführt und für 1 Stunde bis 14 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Abschließend erfolgte die Entfärbung, wobei die Entfärbelösung mehrmals gewechselt wurde. Die Gele wurden zur Dokumentation entweder fotografiert oder eingescannt.

Lösungen für die Proteinaufreinigung

Name	Substanz	c_{end} in H ₂ O
1×PBS	NaCl	154 mM
	Na ₂ HPO ₄	7,7 mM
	NaH ₂ PO ₄	2,2 mM
Ni-NTA W	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH = 7,4	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	10 mM
Ni-NTA E	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH = 7,4	20 mM
	NaCl	0,5 M
	Imidazol	400 mM
Sphäroplast-Puffer	Tris·HCl pH = 8,0	200 mM
	EDTA pH = 8,0	0,5 mM
	Saccharose	750 mM
10×UZ-Puffer	Tris·HCl pH = 8,0	20 mM
	EDTA pH = 8,0	2 mM
	MgCl ₂	5 mM
	NaCl	100 mM
frisch zu 1×UZ-Puffer	RNase	0,1 mg mL ⁻¹
	DNase I	0,1 mg mL ⁻¹
	PMSF	2 mM
	Pepstatin A	0,5 μg mL ⁻¹
	Triton X-100	0,1 % (m/V)
	Benzamidiniumchlorid	2 mM
10×Liposomen-Puffer	Tris·HCl pH = 8,0	20 mM
	MgCl ₂	3 mM
	NaCl	100 mM
Puffer W	1×Liposomen-Puffer	
	CaCl ₂	5 mM

Puffer E	1×Liposom-Puffer EDTA pH = 8,0	20 mM
Puffer I	Tris·HCl pH = 8,0 PMSF Lysozym	50 mM 1 mM 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Puffer II	Tris·HCl pH = 8,0 Harnstoff	50 mM 7.5 M
Puffer C	Tris·HCl pH = 8,0 NaCl	50 mM 100 mM
Puffer D	Tris·HCl pH = 8,0 NaCl	50 mM 1 M
Lysepuffer	NaH_2PO_4 pH = 8,0 NaCl	50 mM 300 mM
Harnstoffpuffer	Harnstoff DTT Tris·HCl pH = 8,0	8 M 5 mM 50 mM

LB-Medium

Substanz	Massenkonzentration / g L^{-1}
Bacto TM Tryptone	10
Bacto TM Yeast Extract	5
NaCl	10

BactoTM Tryptone und BactoTM Yeast Extract wurden von der Firma BD BIOSCIENCES (Franklin Lakes, NJ, USA) bezogen. Vor der Verwendung wurde das Medium autoklaviert und anschließend ausschließlich in steriler Umgebung geöffnet.

New Minimal Medium (NMM)

Zunächst wurde ein Aminosäuremix mit $\text{pH} = 7$ hergestellt. Hierzu wurden auf 1 L je 0,5 g aller Aminosäuren außer Met, Tyr und Trp eingewogen, in 22 mL 1 M KH_2PO_4 und 48 mL K_2HPO_4 gelöst und auf 1 L mit H_2O aufgefüllt. Von Tyr und Trp wurden separat 0,5 g in H_2O unter Zugabe von konz. Salzsäure gelöst. Der Spurenelementemix wurde nach BUDISA *et al.* vorbereitet.^[68]

Substanz	c_{end} in H_2O
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,5 mM
NaCl	8,5 mM
KH_2PO_4	22 mM
K_2HPO_4	47,6 mM
MgSO_4	1 mM
Glucose	20 mM
Aminosäuremix	100 mL L^{-1} Medium
CaCl ₂	1 mg L^{-1}
FeSO ₄	1 mg L^{-1}
Spurenelemente	1 μg L^{-1}
Thiamin	10 mg mL^{-1}
Biotin	10 mg L^{-1}

Alle Komponenten des Mediums wurden vor der Verwendung entweder autoklaviert oder steril filtriert und anschließend nur in steriler Umgebung geöffnet.

Zusätze zu den Medien

Substanz	$c_{\text{Stammlsg.}}$	c_{final}
Ampicillin (Amp)	100 mg mL^{-1} in H_2O	100 μg mL^{-1}
Kanamycin (Kan)	34 mg mL^{-1} in H_2O	34 μg mL^{-1}
IPTG	1 M in H_2O	1 mM

Verwendete *E. coli* Zellstämme

Bakterienstamm	genetische Marker	Herkunft
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	INVITROGEN, Karlsruhe, D
BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>gal</i> λ (DE3)	STRATAGENE, La Jolla, CA, USA
B834(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>gal</i> λ (DE3) <i>metE</i>	NOVAGEN MERCK CHEMICALS LTD., Nottingham, UK

Bei den Stämmen DH5 α und BL21(DE3) handelt es sich um *E. coli* Stämme zur Vermehrung von Plasmiden bzw. zur Proteinexpression. Der Stamm B834(DE3) ist eine Methionin-auxotrophe Variante des Stammes BL21(DE3) und wurde zur Expression für die Einbauexperimente der Methioninanaloga verwendet. Die Lagerung der Zellstämme erfolgte bei -80 °C. Proteine wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 4 °C aufbewahrt.

Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine frische 1-L-Zellkultur in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 herangezogen. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert und zweimal mit jeweils 1 L eiskalter 10%iger (V/V) Glycerinlösung gewaschen. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in der zurückbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und als 80 μ L Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Verwendete Plasmide

Plasmid	Charakteristika	codiertes Protein	Herkunft
pRSETH6HcysK	Expression des Zielproteins mit N-terminalem 6×His-Tag, Amp ^R	rOASS-A	INVITROGEN, Karlsruhe, D
pQE80 ψ - b*	Expression des Zielproteins, Amp ^R	ψ - b*	QIAGEN, Hilden, D
pQE80.L-R2 ψ hEGF	Expression des Zielproteins, Amp ^R	Arg ² - ψ -hEGF	QIAGEN
pQE80.L-G2 ψ hEGF	Expression des Zielproteins, Amp ^R	Gly ² - ψ -hEGF	QIAGEN
pET15b-hEGF	Expression des Zielproteins mit N-terminalem 6×His-Tag, Amp ^R	τ -hEGF	NOVAGEN Darmstadt, D
pREP4	Expression eines <i>lac</i> -Repressors, Kan ^R		QIAGEN
pQE60eGFP	Expression des Zielproteins mit C-terminalem 6×His-Tag, Amp ^R	eGFP	QIAGEN
pQE60eGFP(G2A)	Expression des Zielproteins mit C-terminalem 6×His-Tag, Amp ^R	eGFP(G2A)	QIAGEN
pQE60eGFP(G2R)	Expression des Zielproteins mit C-terminalem 6×His-Tag, Amp ^R	eGFP(G2R)	QIAGEN
pQE80anxA5	Amp ^R	anxA5	QIAGEN
pQE80anxA5(A2G)	Amp ^R	anxA5(A2G)	QIAGEN

pQE80anxA5(A2R) | Amp^R | anxA5(A2R) | QIAGEN

Die Herstellung des Vektors pRSETH6HcysK war Teil dieser Arbeit (siehe unten). Alle anderen Konstrukte wurden freundlicherweise von Frau Petra Birle und Frau Tatjana Krywcun oder Herrn Dr. Yuri Cheburkin zur Verfügung gestellt.

Alle Plasmide werden vom *lac*-System reguliert. Im Fall von pQE60-Plasmiden muss zusätzlich das Coplasmid pREP4 verwendet werden. Dieses codiert den benötigten Repressor, der durch seine Bindung an den *lac*-Operator die Proteinexpression verhindert. Gezielt induziert werden kann die Expression des Zielproteins dann durch die Zugabe von IPTG. Bei allen anderen Plasmiden ist der *lac*-Repressor bereits Bestandteil des Plasmids, so dass kein Coplasmid nötig ist. In diesen Fällen wird die gezielte Proteinexpression ebenfalls durch die Zugabe von IPTG induziert.

Herstellung des Vektors pRSETH6HcysK

Für die Isolierung des Gens *cysK* (OASS-A) aus *E. coli*-Zellen wurden folgende Primer (jeweils mit einer Schnittstelle für *Bam*HI) von der Firma METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D) synthetisiert:

FP *cysK* 5'→3'

CGC CGC CGC CGC GGA TCC AGT AAG ATT TTT GAA GAT AAC TCG CTG
ACT ATC

RP *cysK* 5'→3'

GCG GCG GCG GCG GGA TCC TCA TTA CTG TTG CAA TTC TTT CTC AGT
GAA GAG ATC.

Für die entsprechende PCR wurde folgender Reaktionsmix erstellt:

Substanz	$c_{Stammlsg.}$	c_{final}	V
Template DNA			1 μ L (ca. 10 ng)
FP <i>cysK</i>	100 pmol μ L	50 pmol	0,5 μ L
RP <i>cysK</i>	100 pmol μ L	50 pmol	0,5 μ L
dNTP-Mix	2,5 mM pro Nukleotid		5 μ L
Reaktionspuffer	10 \times	1 \times	5 μ L
Vent Polymerase	2000 U mL ⁻¹	2	1 μ L
H ₂ O			37 μ L

Das entsprechende PCR-Programm ist im Folgenden dargestellt:

95 °C	8 min	1 ×
95 °C	1 min	
56 – 67 °C	1 min	40 ×
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	1 ×
4 °C	∞	1 ×

Die DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe oben) und die Bande mit der richtigen Größe ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA aus der Gelmatrix mit Hilfe des JETSORB Gel Extraction Kits, wobei das Protokoll des Herstellers befolgt wurde. Als einzige Abweichung wurde nicht mit TE-Puffer eluiert, sondern mit 30 μL H_2O .

Daraufhin erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau, um die mittels Primer eingeführten *Bam*HI-Schnittstellen für die Klonierung in den Zielvektor vorzubereiten. Dazu wurde folgender Reaktionsmix erstellt:

Substanz	$c_{\text{Stammlsg.}}$	c_{final}	V
Insert			37 (Gesamtvolumen nach Gelextraktion)
<i>Bam</i> HI	20000 U mL^{-1}	100 U	5
<i>Bam</i> HI-Puffer	10×	1×	10
BSA	100×	1×	1
H_2O			47

Der Reaktionsmix wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits gereinigt, wobei das Protokoll des Herstellers befolgt wurde. Zur visuellen Konzentrationsabschätzung wurde eine weitere Elektrophorese durchgeführt, wobei zusätzlich verschiedene Mengen eines DNA-Fragments vergleichbarer Größe aufgetragen wurde. Nach dieser Methode ergibt sich die Konzentration des Inserts zu ca. 0,08 μg μL^{-1} bei 1000 Bp.

Als Nächstes erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau des Vektors. Dazu wurde der nachstehende Reaktionsmix über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Substanz	$c_{\text{Stammlsg.}}$	c_{final}	V
pRSET6H	0,53 μg μL^{-1}	15 μg	30
<i>Bam</i> HI	20000 U mL^{-1}	100 U	5
<i>Bam</i> HI-Puffer	10×	1×	10
BSA	100×	1×	1
H_2O			54

Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits gereinigt, wobei das Protokoll des Herstellers befolgt wurde. Zur visuellen Konzentrationsabschätzung wurde eine weitere Elektrophorese, wie oben beschrieben, durchgeführt, wobei wiederum zusätzlich ein DNA-Fragment vergleichbarer Größe in unterschiedlichen Mengen aufgetragen wurde. Nach dieser Methode ergibt sich die Konzentration des Inserts zu ca. $0,2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ bei 2800 Bp.

Die nicht für das Gel benötigte Probenmenge wurde im Anschluss mit alkalischer Phosphatase behandelt, um die Religation des geschnittenen Plasmids zu verhindern. Dazu wurde nach den Vorgaben von NEW ENGLAND BIOLABS (NEB, Ipswich, MA, USA) der folgende Reaktionsmix erstellt und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Substanz	$c_{\text{Stammlsg.}}$	c_{final}	V
pRSET6H (verdaut)	$0,2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$		26
Alkalische Phosphatase	10000 U mL^{-1}	10 U	1
NEB-Puffer 3	10×	1×	5
H ₂ O			18

Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des PCR Purification Kits gereinigt. Die Mengenabschätzung erfolgte wie oben beschrieben, wobei sich eine Konzentration von $0,02 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ergab.

Daraufhin erfolgte die Ligation des so präparierten Vektors mit dem Insert. Dazu wurde folgender Reaktionsmix erstellt:

Substanz	$c_{\text{Stammlsg.}}$	c_{final}	V
pRSET6H (verdaut)	$0,02 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	0,1	5
Insert	$0,08 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	0,36	4,5
Ligase-Puffer	10×	1×	2
H ₂ O			7,5

Dieser wurde für 2 – 3 Minuten auf 42°C erwärmt und anschließend für 2 – 3 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von $1 \mu\text{L}$ T4-DNA-Ligase ($400 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) und der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

Als nächster Schritt folgte eine Dialyse, bei der $10 \mu\text{L}$ des Ligationsansatzes auf ein Dialysefilterplättchen aus Nitrocellulose gegeben wurden. Dieses Plättchen wurde dann für ca. 20 Minuten auf die Oberfläche von autoklaviertem Wasser gelegt. Der verbliebene Rest an Ligationsansatz wurde bei -20°C gelagert.

Die $10 \mu\text{L}$ des dialysierten Ligationsansatzes wurde mit $40 \mu\text{L}$ DH5 α -Zellsuspension transformiert (siehe unten). Die abschließende Ausplattierung der transformierten Zellsuspension erfolgte mit 30 bzw. $300 \mu\text{L}$ Zellsuspension auf LB-Agar-Kulturplatten, die mit

Ampicillin versetzt waren.

Anschließend wurden Vorkulturen ($V = 5 \text{ mL}$, siehe unten) erstellt und diese über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension 10 Minuten bei 13000 rpm (Zentrifuge: 5415 C) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand für die Miniplasmidpräparation mittels QIAprep[®] Spin Miniprep Kit verwendet, wobei das Protokoll des Herstellers befolgt wurde.

Abschließend wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Klonierung erfolgreich war, d. h. das Insert sich an der entsprechenden Position in der richtigen Orientierung im Vektor befand. Dazu wurde der folgende Reaktionsmix für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Substanz	$c_{\text{Stammlsg.}}$	c_{final}	V
pRSET6HcysK (Eluat der Minipräparation)			10
<i>Hind</i> III	20000 U mL^{-1}	10	0,5
<i>Nco</i> I	10000 U mL^{-1}	10	1
NEB-Puffer 2	$10\times$	$1\times$	1,5
H ₂ O			7,5

Die entstandenen DNA-Fragmente wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese in der bereits beschriebenen Art und Weise getrennt und die Größe der einzelnen Fragmente mit Hilfe des ebenfalls aufgetragenen Markers Lambda DNA-*Bst*E II Digest (NEB, Ipswich, MA, USA) abgeschätzt.

Zur Analyse wurde der konstruierte Vektor sequenziert, wobei u. a. die PCR-Primer sowie ein weiterer Primer ($5' \rightarrow 3'$: CAG GTT GAT TTT ATT) verwendet wurden. Durch diese Analyse wurde verifiziert, dass es sich bei dem Konstrukt um den gewünschten Vektor handelt. Dieser konnte somit für die Proteinexpression verwendet werden.

Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation elektrokompenter Zellen mit einem Plasmid wurden $80 \mu\text{L}$ Zellen mit ca. $1 \mu\text{g}$ Plasmid (im Fall von pQE60-Plasmiden wurde zusätzlich $1 \mu\text{g}$ pREP4 zugeben) auf Eis gemischt und in eine sterile Elektroporationsküvette (BIORAD, Hercules CA, USA) überführt. Daraufhin wurde die Suspension einer elektrischen Spannung von 1650 V ausgesetzt. Anschließend wurde die Suspension sofort mit 1 mL LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 800 rpm geschüttelt. Abschließend wurden zwischen 10 und $500 \mu\text{L}$ der Zellsuspension auf LB-Platten mit dem/n entsprechenden Antibiotikum/a ausplattiert und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht inkubiert.

Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Zellen

Vorkulturen ($V = 5$ mL) wurden mit Hilfe von Einzelkolonien von LB-Agar-Platten erstellt. Die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen erfolgte im Allgemeinen durch Animpfen von LB-Medium bzw. NMM mit Vorkultur (1000:1, V/V) und anschließender Inkubation bei 37 °C in einem Umluftinkubator mit Schüttelfunktion (200 rpm). Bei plasmidtragenden Stämmen bzw. nach Transformationen wurde/n das/die entsprechende/n Antibiotikum/a zugegeben. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt, wobei nach SAMBROOK *et al.*^[154] Folgendes gilt:

$$OD_{600} = 1 \approx 8 \times 10^8 \text{ Zellen mL}^{-1} \quad (5)$$

Vorkulturen konnten für wenige Tage bei 4 °C gelagert werden. Eine längerfristige Aufbewahrung erfolgte mittels Glycerinkulturen. Zu deren Herstellung wurden 850 μ L einer Über-Nacht-Kultur mit 150 μ L 87%ige (V/V) Glycerinlösung versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Testexpressionen

Bevor Proteine in großer Menge exprimiert wurden, wurde mittels Testexpressionen ermittelt, ob die Zellen erfolgreich transformiert wurden und zur Überexpression des Zielproteins in der Lage waren. Dazu wurden *E. coli*-Zellen des entsprechenden Zellstammes in der oben beschriebenen Art und Weise mit dem zielproteintragenden Plasmid transformiert und Einzelkolonien in einem Volumen von 5 mL angezogen. Bei einer OD_{600} von 0,6 – 0,8 wurde 1 mL Zellsuspension mit 1 μ L IPTG (1 M, $c_{final} = 1$ mM) versetzt und über Nacht bei 30 °C und 550 rpm inkubiert (zum Auffinden optimaler Expressionsbedingungen kann es aber nötig sein, die Temperatur von 25 – 37 °C bzw. die Expressionszeit von 1 Stunde bis über Nacht zu variieren). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 13000 rpm (Zentrifuge 5415 C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 50 μ L H₂O und 50 μ L 2 \times SDS-PAGE-Auftragspuffer resuspendiert und für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt. Abschließend erfolgte die SDS-PAGE-Analyse, wobei ein Molekulargewichtsstandard sowie eine nicht induzierte Probe zu Vergleichszwecken aufgetragen wurden.

Löslichkeitstest

Um zu überprüfen, ob das Zielprotein in löslicher Form oder in sogenannten Inclusion Bodies exprimiert wurde, wurde das durch Zentrifugation erhaltene Zellpellet eines Expres-

sionstests in 50 μL H_2O resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (5 min, 13000 rpm, Zentrifuge: 5415 C) und der Überstand mit 50 μL 2 \times SDS-PAGE-Auftragspuffer versetzt. Der Rückstand wurde hingegen in 50 μL Harnstoff-Puffer (50 mM Tris·HCl pH = 7,5; 6 M Harnstoff, 2 % SDS (V/V)) resuspendiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 50 μL 2 \times SDS-PAGE-Auftragspuffer hinzugegeben und die Proben für 5 Minuten auf 95 $^\circ\text{C}$ erhitzt und abschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

Proteinexpressionen

Zur Expression von rOASS-A in großer Kultur wurden 1,4 L LB_{Amp} -Medium mit 1,4 mL Vorkultur angeimpft und bei 37 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von ca. 0,6 wurde das Medium mit 1,4 mL IPTG (1 M, $c_{\text{final}} = 1 \text{ mM}$) versetzt und über Nacht bei 30 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Bei der Expression ist darauf zu achten, dass das Verhältnis von Medium zu Luft im Kulturkolben ca. 2:1 beträgt.

Zur Expression von den Modellproteinen ψ -Barstar, ψ -hEGF, τ -hEGF, eGFP und anxA5 nach der SPI-Methode wurde 1 mL der entsprechenden Vorkultur in 1 L NMM (inkl. den nötigen Antibiotika) gegeben. Außerdem wurde das Medium mit einer limitierten Konzentration an Methionin (0,025 mM) versetzt. Die Zellkultur wurde bei 37 $^\circ\text{C}$ bis zur stationären Phase herangezogen, die idealerweise im Bereich von $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,8$ liegen sollte. (die stationäre Phase gilt als erreicht, wenn sich in 30 Minuten die OD_{600} nicht mehr verändert). Nach Erreichen der stationären Phase wurden 50 – 100 mg L^{-1} des Methioninanalogs zum Medium hinzugegeben und die Überexpression des Zielproteins mit 1 mL IPTG (1 M, $c_{\text{final}} = 1 \text{ mM}$) induziert. Es wurde jeweils für vier Stunden bei 30 $^\circ\text{C}$ inkubiert.

Ni-NTA-Chromatographie

Proteine, die über einen C- oder N-terminalen His-Tag verfügen, können mit Hilfe der Ni-NTA-Chromatographie gereinigt werden.

Zunächst wurde die entsprechende Säule (QIAGEN, Hilden, D) mit 100 mM Nickel(II)-acetatlösung beladen, nicht gebundenes Ni^{2+} mit Hilfe von fünf Säulenvolumen H_2O entfernt und die Säule mit fünf Säulenvolumen Ni-NTA W-Puffer equilibriert.

Nach dem Auftragen der proteinhaltigen wässrigen Lösung wird die Säule mit 5 bis 15 Säulenvolumen Ni-NTA W gewaschen und das Zielprotein anschließend mit 5 bis 10 Säulenvolumen Ni-NTA E eluiert. Im Fall einer Aufreinigung mit Hilfe des Äkta-Explorers (GE HEALTHCARE, München, D) bzw. der Äkta-Basic (GE HEALTHCARE) wird die Säule

le mit Ni-NTA W gewaschen und das Protein mittels eines Gradienten von 0 – 100 % Ni-NTA E eluiert.

Abschließend erfolgt ein Waschschrift von fünf Säulenvolumen mit Ni-NTA W und fünf Säulenvolumen 0,1 % NaN_3 (V/V) zur Lagerung.

Proteinaufreinigung rOASS-A

Nach der Über-Nacht-Inkubation bei 30 °C wurde die Zellsuspension bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Rotor: JLA 8.1000) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde in ca. 40 mL 1×PBS-Puffer resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Daraufhin wurde die Suspension bei 4 °C für 40 Minuten bei 15000 rpm (Rotor: JA 20) zentrifugiert und der Überstand mittels Ni-NTA-Chromatographie gereinigt. Die eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft und die reinen Fraktionen vereinigt. Anschließend wurde die Lösung dreimal bei 4 °C gegen 5 L 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH = 8,0 dialysiert (MWCO = 12 – 14000), steril filtriert bzw. mittels Vivaspin 20 SARTORIUS, Göttingen, D, MWCO = 10000) konzentriert und dann steril filtriert. Bei der Expression wurden im Durchschnitt Ausbeuten von 15 mg L^{-1} erreicht. Daher war es nicht notwendig, den Anteil, der in Inclusion Bodies exprimiert wurde, ebenfalls aufzureinigen.

Proteinaufreinigung der ψ -Barstar Varianten

Nachdem für vier Stunden bei 30 °C exprimiert wurde, wurde die Zellsuspension 10 Minuten bei 4 °C und 8000 rpm (Rotor: JLA 8.1000) zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 30 mL Puffer I resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall lysiert und die Suspension bei 4 °C für 40 Minuten bei 15000 rpm (JA 20) zentrifugiert. Der verbliebene Rückstand wurde in ca. 15 mL Puffer II homogenisiert. Die gelbliche Lösung wurde erneut zentrifugiert (40 Minuten, 9000 rpm (JA 20)) und der Überstand bei 4 °C dreimal gegen 5 L Puffer C dialysiert (MWCO = 3000). Ungefaltete Proteinanteile sowie unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (40 Minuten, 15000 rpm, JA 20) entfernt und auf eine Hi-Trap Q-Sepharose-Säule (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) gegeben. Diese wurde anschließend mit Puffer C gewaschen und das Zielprotein mit einem Gradienten von 0 – 100 % Puffer D eluiert. Abschließend wurden die Proteinlösungen steril filtriert bzw. bei Bedarf mit Hilfe von Vivaspins 20 (MWCO = 3000) ankonzentriert und dann steril filtriert. Die Ausbeute der Met-Variante lag bei ca. 10 mg L^{-1} Protein und die der Varianten mit nicht-kanonischen Analoga bei ca. 5 mg L^{-1} .

Proteinaufreinigung der ψ -hEGF Mutanten und Varianten

Nach der vierstündigen Inkubation bei 30 °C wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 8000 rpm (JLA 8.1000) für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in Lysepuffer resuspendiert, die Lösung mit Lysozym, DNase und RNase versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Hilfe von Ultraschall lysiert und die Suspension wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 15000 rpm (Rotor: JA 20) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand gegen 5 L 400 mM Arginin und 50 mM Tris·HCl pH = 8,0 für 4 Stunden dialysiert und danach jeweils zweimal mindestens vier Stunden gegen 50 mM Tris·HCl pH = 8,0. Die Dialyseschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Dialyse wurde ein weiteres Mal wie beschrieben zentrifugiert und der Überstand auf eine HiTrap Q-Sepharose-Säule (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) gegeben. Diese wurde anschließend mit Puffer C gewaschen und das Zielprotein mit einem Gradienten von 0 – 100 % Puffer D eluiert. Abschließend wurden die Proteinlösungen steril filtriert bzw. bei Bedarf mit Hilfe von Vivaspin 20 (MWCO = 3000) ankonzentriert und dann steril filtriert. Die Ausbeute der jeweiligen Met-Variante lag bei ca. 0,2 – 0,5 mg L⁻¹ Protein und die der Mutanten bzw. Varianten mit nicht-kanonischen Analoga bei ca. 0,1 – 0,4 mg L⁻¹.

Proteinaufreinigung der τ -hEGF und Varianten

Die Reinigung der τ -hEGF Mutanten und Varianten verlief analog zur Reinigung der ψ -hEGF Mutanten und Varianten mit der Ausnahme, dass nach den Dialysen und der darauf folgenden Zentrifugation der Überstand mittels Ni-NTA-Chromatographie gereinigt wurde. Auch hier lag die Ausbeute der Met-Variante bei ca. 0,2 – 0,5 mg L⁻¹ Protein und die der Varianten mit nicht-kanonischen Analoga bei ca. 0,1 – 0,4 mg L⁻¹.

Proteinaufreinigung der eGFP Mutanten und Varianten

Nach der Inkubation für vier Stunden bei 30 °C wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 8000 rpm (Rotor: JLA 8.1000) für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in ca. 30 mL Ni-NTA W-Puffer resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall lysiert. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C und 15000 rpm (Rotor: JA 20) für 40 Minuten zentrifugiert und der Überstand mittels Ni-NTA-Chromatographie gereinigt. Die eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft und die reinen Fraktionen vereinigt und dreimal für jeweils sechs Stunden gegen 5 L 50 mM Tris·HCl bei 4 °C dialysiert (MWCO = 12 – 14000). Die Proteinlösung wurde daraufhin

steril filtriert oder bei Bedarf mittels Vivaspin 20 (MWCO = 10000) ankonzentriert und dann steril filtriert. Die Ausbeute der Met-Varianten lag zwischen 2 und 8 mg L⁻¹ und die der Varianten mit nicht-kanonischen Analoga bei 0 – 2 mg L⁻¹.

Proteinaufreinigung der *anxA5* Mutanten und Varianten

Nach vier Stunden Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen 10 Minuten bei 4 °C und 8000 rpm (Rotor: JLA 8.1000) zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in ca. 100 mL Sphäroplast-Puffer resuspendiert, mit 2 mL Lysozym (10 mg mL⁻¹) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Lösung mehrmals geschüttelt wurde. Daraufhin wurde bei 4 °C für 10 Minuten bei 3000 rpm (Rotor: JA 10) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde in 10 mL 1×UZ-Puffer (inkl. Zusätzen, siehe oben) resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Über Nacht wurde bei 4 °C und 32000 rpm (Rotor: 45 TI) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 600 µL CaCl₂ (1 M) sowie 1 – 2 mL Liposomenlösung versetzt. Die Liposomenlösung wurde zuvor wie folgt hergestellt: 1 g Brain Extract Type III, Folch Fraktion III vom Rinderhirn (SIGMA, Taufkirchen, D) wurden in 3 mL Chloroform suspendiert und das Lösungsmittel anschließend im Stickstoffstrom entfernt (ca. 15 Minuten). Daraufhin wurde der Rückstand in 5 – 10 mL Diethylether resuspendiert und das Lösungsmittel wiederum im Stickstoffstrom entfernt (ca. 20 Minuten). Abschließend wurde der Rückstand mit 10 mL 1×Liposomen-Puffer mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Der mit Liposomenlösung versetzte Überstand wurde für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C und 32000 rpm (Rotor: 45 TI) für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Rückstand mit Puffer W gewaschen und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Daraufhin wurde der Rückstand mit 30 – 40 mL Puffer E versetzt und bei 4 °C für 2 Stunden bei 45000 rpm (Rotor: 60 TI) zentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht gegen 5 L H₂O und danach zweimal für jeweils 6 Stunden gegen 5 L 10 mM Tris-HCl pH = 8,0 dialysiert (MWCO = 12 – 14000). Abschließend wurde die Proteinlösung steril filtriert bzw. bei Bedarf mit Hilfe von Vivaspin 20 (MWCO = 10000) ankonzentriert und dann steril filtriert. Die Ausbeute der Met-Varianten lag zwischen 2 und 8 mg L⁻¹ und die der Varianten mit nicht-kanonischen Analoga bei 0 – 2 mg L⁻¹.

Aktivitätsassay für rOASS-A

Die qualitative Bestimmung der Aktivität des Enzyms rOASS-A erfolgte analog zur Vorschrift von TAI *et al.*^[108] Zu einer Lösung aus 100 mM HEPES pH = 7,0 und 50 µM

5-Mercapto-2-nitrobenzoat (**17**, TNB) sowie $0,8 \mu\text{M}$ rOASS-A wurden 4 mM *O*-Acetyl-L-serin (**16**) gegeben und nach 0, 10, 190 und 1100 Minuten UV/Vis-Spektren im Bereich von 240 bis 600 nm aufgenommen. Aus der Abnahme der Intensität der Absorption bei 412 nm sowie der Zunahme der Absorption bei 320 nm kann auf die Aktivität des Enzyms geschlossen werden. Das für die Reaktion benötigte TNB (**17**) wurde stets frisch durch Reduktion von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) mittels geringem Überschuss an DTT selbst hergestellt und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Der Assay wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Barnaseinhibitions-Assay für die Varianten von ψ -Barstar

Der Barnaseinhibitions-Assay wurde nach der Vorschrift von HARTLEY durchgeführt.^[115] Der verwendete Puffer bestand aus $0,2 \text{ M}$ Ammoniumacetat $\text{pH} = 8,0$ sowie $0,01 \text{ M}$ EDTA und $0,01 \text{ M}$ 2-Mercaptoethanol. Zu $1,8 \text{ mL}$ dieser Lösung wurden $10 \mu\text{L}$ Barnase ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) und $10 \mu\text{L}$ Fluorescein-dArGdAdA-TAMRA ($3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) gegeben und in eine Küvette mit Magnetrührer überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von $10 \mu\text{L}$ ψ -Barstar bzw. seiner Varianten in Massenkonzentrationen von 20 bis $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sofort nach der Zugabe des Proteins wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität gemessen (Anregung: 489 nm, Slit: 5 nm, Emission: 519 nm, Slit: 5 nm). Die Fluoreszenz nach 40 Sekunden wurde gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Im Fall einer erfolgreichen Inhibition war keine Fluoreszenz bei 519 nm detektierbar.

Kupfer-katalysierte Huisgen-Cycloaddition auf Proteinebene

Die Proteinvarianten mit eingebautem Hpg oder Aha wurden im Allgemeinen wie folgt mit einem Azid oder Alkin konjugiert: Zu $400 \mu\text{L}$ einer Proteinlösung ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ in Tris·HCl $\text{pH} = 7,5$) wurden $100 \mu\text{L}$ Tris·HCl $\text{pH} = 7,5$ sowie $100 \mu\text{L}$ des jeweiligen Reaktionspartners ($1 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$) gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils $50 \mu\text{L}$ Kupfer(II)-sulfat (50 mM) und L-Ascorbinsäure (50 mM). Dabei hat es sich bewährt, CuSO_4 und L-Ascorbinsäure vorher miteinander zu mischen und dann gemeinsam zur Reaktionslösung zu geben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ oder Raumtemperatur für 1 – 48 Stunden. Daraufhin wurden die niedermolekularen Reagenzien durch Dialyse entfernt, wobei bei Bedarf gleichzeitig zu $1 \times \text{PBS}$ umgepuffert wurde. Die Ausbeuten betragen zwischen 20 und 80 %, und der Konjugationsgrad 20 bis 100 %.

5 Literatur

- [1] F. H. C. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1957**, *12*, 138–163.
- [2] G. Trinquier, Y.-H. Sanejouand, *Prot. Engin.* **1998**, *11*, 153–169.
- [3] N. Budisa, *Engineering the Genetic Code*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [4] F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* **1966**, *19*, 548–555.
- [5] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 9. Aufl., **2006**.
- [6] A. Böck *et al.*, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 515–520.
- [7] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, *296*, 1459–1462.
- [8] M. Ibba, H. D. Becker, C. Stathopoulos, D. L. Tumbula, D. Söll, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 311–316.
- [9] B. S. Laursen, H. P. Sorensen, K. K. Mortensen, H. U. Sperling-Petersen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, *69*, 101–123.
- [10] G. Michal, *Biochemical Pathways*, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin, **1999**.
- [11] J. T. Brosnan, M. E. Brosnan, *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1636S–1640S.
- [12] G. D. Rose, A. R. Geselowitz, G. J. Lesser, R. H. Lee, M. H. Zehfus, *Science* **1985**, *229*, 834–838.
- [13] A. R. Viguera, L. Serrano, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8771–8779.
- [14] E. R. Stadtman, J. Moskovitz, R. L. Levine, *Antioxid. Redox Signal.* **2003**, *5*, 577–582.
- [15] L. Kuschel *et al.*, *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 17–21.
- [16] S. D. Black, D. R. Mould, *Anal. Biochem.* **1991**, *193*, 72–82.
- [17] R. L. Levine, J. Moskovitz, E. R. Stadtman, *IUBMB Life* **2000**, *50*, 301–307.
- [18] T. Hoshi, S. H. Heinemann, *J. Physiol.* **2001**, *531*, 1–11.
- [19] R. L. Levine, L. Mosoni, B. S. Berlett, E. R. Stadtman, *PNAS* **1996**, *93*, 15036–15040.

- [20] J. Moskovitz, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 213–219.
- [21] I. G. Old, S. E. V. Phillips, P. G. Stockley, I. Saint Girons, *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **1991**, *56*, 145–185.
- [22] J. T. Brosnan, M. E. Brosnan, R. F. P. Bertolo, J. A. Brunton, *Livestock Sci.* **2007**, *112*, 2–7.
- [23] A. J. Cooper, *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 187–222.
- [24] S. H. Mudd, J. R. Poole, *Metabolism* **1975**, *24*, 721–735.
- [25] P. W. Beatty, D. J. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *204*, 80–87.
- [26] E. Mosharov, M. R. Crawford, R. Banerjee, *Biochemistry* **2000**, *39*, 13005–13011.
- [27] G. L. Cantoni, *J. Biol. Chem.* **1953**, *204*, 403–416.
- [28] S. Roje, *Phytochem.* **2006**, *67*, 1686–1698.
- [29] D. S. Peabody, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5031–5035.
- [30] H. J. Drabkin, U. L. RajBhandary, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 5140–5147.
- [31] R. Chattapadhyay, H. Pelka, L. H. Schulman, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4263–4268.
- [32] T. Meinnel, Y. Mechulam, S. Blanquet, *Biochimie* **1993**, *75*, 1061–1075.
- [33] J. P. Waller, *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 483–496.
- [34] A. J. Link, K. Robison, G. M. Church, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1259–1313.
- [35] C. Giglione, A. Boularot, T. Meinnel, *Cell. Mol. Life. Sci.* **2004**, *61*, 1455–1474.
- [36] R. A. Bradshaw, W. W. Brickey, K. W. Walker, *Trends in Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 263–267.
- [37] F. Sherman, J. W. Stewart, S. Tsunasawa, *Bioessays* **1985**, *3*, 27–31.
- [38] J. Solbiati, S. Chapman-Smith, J. L. Miller, C. G. Miller, J. E. Cronan, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 607–614.
- [39] C. Flinta, B. Persson, H. Jörnvall, G. von Heijne, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *154*, 193–196.
- [40] J. L. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *294*, 527–529.

- [41] P.-H. Hirel, J.-M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, *PNAS* **1989**, *86*, 8247–8251.
- [42] H. Dalboge, S. Bayne, J. Pedersen, *FEBS Lett.* **1990**, *266*, 1–3.
- [43] W. T. Lowther, A. M. Orville, D. T. Madden, S. Lim, D. H. Rich, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7678–7688.
- [44] A. Bachmair, D. Finley, A. Varshavsky, *Science* **1986**, *234*, 179–186.
- [45] P. Selvakumar, A. Lakshmiikuttyamma, J. R. Dimmock, R. K. Sharma, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1765*, 148–154.
- [46] M. D. Vaughan, P. B. Sampson, J. F. Honek, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 385–409.
- [47] M. Mann, O. N. Jensen, *Nature Biotech.* **2003**, *21*, 255–261.
- [48] T. Meinnel, C. Giglione, *Proteomics* **2008**, *8*, 626–649.
- [49] C. T. Walsh, *Posttranslational Modification of Proteins*, Roberts & Co Publ., **2005**.
- [50] H.-J. Gabius, *Naturwissenschaften* **2000**, *87*, 108–121.
- [51] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740–764.
- [52] Löffler *et al.*, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12005–12014.
- [53] T. R. Gemmill, R. B. Trimble, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 227–237.
- [54] P. M. Rudd, R. A. Dwek, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *32*, 1–100.
- [55] M. R. Wormald, R. A. Dwek, *Struct. Fold. Des.* **1999**, *7*, R155–R160.
- [56] M. R. Wormald, A. J. Petrescu, Y.-L. Pao, A. Glithero, T. Elliott, R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 371–386.
- [57] K. E. Krueger, S. Srivastava, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1799–1810.
- [58] F. Lolli *et al.*, *PNAS* **2005**, *102*, 10273–10278.
- [59] M. C. Alcaro, A. M. Papini, *Biopolymers* **2006**, *84*, 349–367.
- [60] C. Breithaupt *et al.*, *PNAS* **2003**, *100*, 9446–9451.
- [61] G. deSantis, J. B. Jones, *Methods in Molecular Biology: In vitro mutagenesis protocols*, Vol. 182 (Ed: J. Braman), Humana Press, Totowa, **2002**, 55–65.

- [62] N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6586–6624.
- [63] S. Lepthien, B. Wiltschi, B. Bolic, N. Budisa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *73*, 740–754.
- [64] F. Chapeville, F. Lipmann, G. von Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray, S. Benzer, *PNAS* **1962**, *48*, 1086–1092.
- [65] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66.
- [66] D. Gross, H. Tarver, *J. Bio. Chem.* **1955**, *217*, 169–182.
- [67] R. E. Connor, D. A. Tirrell, *Polymer Rev.* **2007**, *47*, 9–28.
- [68] N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 788–796.
- [69] J. H. Bae *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 1071–1081.
- [70] M. Rubini, S. Lepthien, R. Golbik, N. Budisa, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 1147–1158.
- [71] F. P. J. T. Rutjes, L. B. Wolf, H. E. Schoemaker, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 4197–4212.
- [72] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5320–5374.
- [73] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [74] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [75] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941.
- [76] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
- [77] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [78] J. P. Tam, Y. Lu, C. Liu, J. Shao, *PNAS* **1995**, *92*, 12485–12489.
- [79] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
- [80] A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94–95.
- [81] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604–637.
- [82] H. Beyer, W. Walter, W. Francke, *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart – Leipzig, 23. Aufl., **1998**.

- [83] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [84] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [85] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nature Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [86] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [87] A. J. Link, D. A. Tirrell, *Methods* **2005**, *36*, 291–298.
- [88] K. Kodama *et al.*, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 134–139.
- [89] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *PNAS* **2002**, *99*, 19–24.
- [90] J. C. M. van Hest, K. L. Kiick, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1282–1288.
- [91] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164–11165.
- [92] K. E. Beatty, F. Xie, Q. Wang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14150–14151.
- [93] S. I. van Kasteren *et al.*, *Nature* **2007**, *446*, 1105–1109.
- [94] K. Kirshenbaum, I. S. Carrico, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 235–237.
- [95] A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782–11783.
- [96] A. Kamal, Y. Damayanthi, B. S. Narayan Reddy, B. Lakminarayana, B. S. Praveen Reddy, *Chem. Commun.* **1997**, 1015–1016.
- [97] A. Wang, N. W. Nairn, R. S. Johnson, D. A. Tirrell, K. Grabstein, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 324–330.
- [98] B. Mulinacci, *Dissertation (Universität Florenz)* **2004**.
- [99] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *DDT* **2003**, *8*, 1128–1137.
- [100] J. B. Mangold, M. R. Mischke, J. M. LaVelle, *Mutation Res.* **1989**, *216*, 27–33.
- [101] T. H. P. Maier, *Nature Biotech.* **2003**, *21*, 422–427.
- [102] W. M. Rabeh, S. S. Alguindigue, P. F. Cook, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5541–5550.

- [103] P. Burkhard, G. S. J. Rao, E. Hohenester K. D. Schnackerz, P. F. Cook, J. N. Janssonius, *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 121–133.
- [104] C.-H. Tai, P. F. Cook, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 49–59.
- [105] GIB-Datenbank,
http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Ecol_K12_MG1655.
- [106] Expasy-Datenbank, <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>.
- [107] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [108] C.-H. Tai, S. R. Nalabolu, T. M. Jacobson, D. E. Minter, P. F. Cook, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6433–6442.
- [109] J. G. Adamson, T. Hoang, A. Crivici, G. A. Lajoie, *Anal. Biochem.* **1992**, *202*, 210–214.
- [110] S. Nagai, M. Flavin, *Methods Enzymol.* **1971**, *17B*, 423–424.
- [111] A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10598–10602.
- [112] R. Golbik, G. Fischer, A. R. Fersht, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1505–1514.
- [113] G. Chen, E. Battaglia, C. Senay, C. N. Falany, A. Radominska-Pandya, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2151–2157.
- [114] N. E. Zachara, G. W. Hart, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 431–438.
- [115] R. W. Hartley, *Methods Enzymol.* **2001**, *341*, 599–611.
- [116] Y. Shinohara, Y. Hasegawa, H. Kaku, N. Shibuya, *Glycobiology* **1997**, *7*, 1201–1208.
- [117] N. Budisa, R. Huber, R. Golbik, C. Minks, E. Weyher, L. Moroder, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253*, 1–9.
- [118] G. Carpenter, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7709–7712.
- [119] A. Ruschel, A. Ullrich, *Cell. Signal.* **2004**, *16*, 1249–1261.
- [120] S. Hakomori, *PNAS* **2002**, *99*, 10231–10233.
- [121] K. M. Davis-Fleischer, G. E. Besner, *Frontiers in Bioscience* **1998**, *3*, D288–299.
- [122] X. Sha, A. M. Brunner, A. F. Purchio, L. E. Gentry, *Mol. Endocrinol.* **1989**, *3*, 1090–1098.

- [123] K. Fukuta, K. Matsumoto, T. Nakamura, *Biochem. J.* **2005**, *388*, 555–562.
- [124] PDB-Datenbank, <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3EGF>.
- [125] K. Josephson, M. C. T. Hartman, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11727–11735.
- [126] E. R. Stadtman, *Free Rad. Biol. Med.* **1990**, *9*, 315–325.
- [127] S.-H. Chiou, *J. Biochem.* **1983**, *94*, 1259–1267.
- [128] J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9026–9027.
- [129] Y.-D. Liao, J.-C. Jeng, C.-F. Wang, S.-C. Wang, S.-T. Chang, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1802–1810.
- [130] K. L. Kiick, R. Weberskirch, D. A. Tirrell, *FEBS Lett.* **2001**, *502*, 25–30.
- [131] F. Frottin *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 2336–2349.
- [132] A. C. Looman *et al.*, *EMBO J.* **1987**, *6*, 2489–2492.
- [133] T. Tsalkova, O. W. Odom, G. Kramer, B. Hardesty, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 713–723.
- [134] M. H. Richmond, *Bacteriol. Rev.* **1962**, *26*, 398–420.
- [135] S. S. Kerwar, H. Weissbach, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *141*, 525–532.
- [136] T. Ohta, S. Nakajima, Z. Sato, T. Aoki, S.-I. Hatanaka, S. Nozoe, *Chem. Lett.* **1986**, 511–512.
- [137] M. C. T. Hartmann, K. Josephson, J. W. Szostak, *PNAS* **2006**, *103*, 4356–4361.
- [138] M. C. T. Hartmann, K. Josephson, C.-W. Lin, J. W. Szostak, *PLOS one* **2007**, *2*, e972.
- [139] R. Huber, J. Römisch, E.-P. Paques, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3867–3874.
- [140] PDB-Datenbank, <http://www.pdb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1AVH>.
- [141] PDB-Datenbank, <http://www.pdb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1EMA>.
- [142] F. H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L. C. Gershman, G. T. Reynolds, J. R. Waters, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *60*, 85–103.

- [143] J. G. Morin, J. W. Hastings, *J. Cell. Physiol.* **1971**, *77*, 313–318.
- [144] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, S. Falkow, *Gene* **1996**, *173*, 33–38.
- [145] R. H. Valdivia, A. E. Hromockyj, D. Monack, L. Ramakrishnan, S. Falkow, *Gene* **1996**, *173*, 47–52.
- [146] F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips, *Nature Biotech.* **1996**, *14*, 1246–1251.
- [147] R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, *Nature* **1995**, *373*, 663–664.
- [148] A. Varshavsky, *Cell* **1992**, *69*, 725–735.
- [149] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, 5. Aufl., **1995**.
- [150] J. Podlech, M. Gurrath, G. Müller, *Houben-Weyl, Methods of organic chemistry*, E 22a (Eds: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo), Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, **2002**, 61.
- [151] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [152] SDBS-Datenbank,
http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.
- [153] S. Rath, C. M. Stanley, M. W. Steward, *J. Immunol. Meth.* **1988**, *106*, 245–249.
- [154] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press – New York, 2. Aufl., **1989**.

Anhang A

I Aminosäuresequenz von rOASS-A

MAHHH HHHGS SKIFE DNSLT IGHTP LVRLN RIGNG RILAK VESRN PSFSV KCRIG ANMIW
 DAEKR GVLKP GVELV EPTSG NTGIA LAYVA AARGY KLTLT MPETM SIERR KLLKA LGANL
 VLTEG AKGMK GAIQK AEEIV ASNPE KYLLL QQFSN PANPE IHEKT TGPEI WEDTD GQVDV
 FIAGV GTGGT LTGVS RYIKG TKGKT DLISV AVEPT DSPVI AQALA GEEIK PGPBK IQGIG
 AGFIP ANLDL KLVDK VIGIT NEEAI STARR LMEEE GILAG ISSGA AVAAA LKLQE DESFT
 NKNIV VILPS SGERY LSTAL FADLF TEKEL QQ

II Aminosäuresequenz von ψ -b*

MKKAV INGEQ IRSIS DLHQT LKKEL ALAEY YGENL DALWD ALTGW VEYPL VLEWR QFEQS
 KQLTE NGAES VLQVF REAKA EGADI TIILS

III Aminosäuresequenz von Met¹-Arg²-Asn³- ψ -hEGF

MRNSD SECPL SHDGY CLHDG VCIYI EALDK YACNC VVGVI GERCQ YRDLK WWELR

IV Aminosäuresequenz von Met¹-Gly²-Asn³- ψ -hEGF

MGNSD SECPL SHDGY CLHDG VCIYI EALDK YACNC VVGVI GERCQ YRDLK WWELR

V Aminosäuresequenz von τ -hEGF

MGSSH HHHHH SGLV PRGSH MRNSD SECPL SHDGY CLHDG VCMYI EALDK YACNC VVGVI
 GERCQ YRDLK WWELR

VI Aminosäuresequenz von eGFP

MGSSV SKGEE LFTGV VPILV ELDGD VNGHK FSVSG EGED ATYK LTLKF ICTTG KLPVP
 WPTLV TTLTY GVQCF SRYPD HMKQH DFFKS AMPEG YVQER TIFFK DDGNY KTRAE VKFEG
 DTLVN RIELK GIDFK EDGNI LGHKL EYNYN SHNVY IMADK QKNGI KVNFK IRHNI EDGSV
 QLADH YQQNT PIGDG PVLLP DNHYL STQSA LSKDP NEKRD HMLL EFTVTA AGITL GMDEL
 YKHHH HHH

VII Aminosäuresequenz von eGFP(G2A)

MASSV SKGEE LFTGV VPILV ELDGD VNGHK FSVSG EGED ATYK LTLKF ICTTG KLPVP
 WPTLV TTLTY GVQCF SRYPD HMKQH DFFKS AMPEG YVQER TIFFK DDGNY KTRAE VKFEG
 DTLVN RIELK GIDFK EDGNI LGHKL EYNYN SHNVY IMADK QKNGI KVNFK IRHNI EDGSV

QLADH YQQNT PIGDG PVLLP DNHYL STQSA LSKDP NEKRD HMVLL EFVTA AGITL GMDEL
YKHHH HHH

VIII Aminosäuresequenz von eGFP(G2R)

MRSSV SKGEE LFTGV VPILV ELDGD VNGHK FSVSG EGEDD ATYVK LTLKF ICTTG KLPVP
WPTLV TTLTY GVQCF SRYPD HMKQH DFFKS AMPEG YVQER TIFFK DDGNY KTRAE VKFEG
DTLVN RIELK GIDFK EDGNI LGHKL EYNYN SHNVY IMADK QKNGI KVNFK IRHNI EDGSV
QLADH YQQNT PIGDG PVLLP DNHYL STQSA LSKDP NEKRD HMVLL EFVTA AGITL GMDEL
YKHHH HHH

IX Aminosäuresequenz von anxA5

MAQVL RGTVT DFPGF DERAD AETLR KAMKG LGTDE ESILT LLTSR SNAQR QEISA AFKTL
FGRDL LDDLK SELTG KFEKL IVALM KPSRL YDAYE LKHAL KGAGT NEKVL TEIIA SRTPE
ELRAI KQVYE EEYGS SLEDD VVGDT SGYYQ RMLVV LLQAN RDPDA GIDEA QVEQD AQALF
QAGEL KWGTD EEKFI TIFGT RSVSH LRKVF DKYMT ISGFQ IEETI DRETS GNLEQ LLLAV
VKSIR SIPAY LAETL YYAMK GAGTD DHTLI RVMVS RSEID LFNIR KEFRK NFATS LYSMI
KGDTS GDYKK ALLLL CGEDD

X Aminosäuresequenz von anxA5(A2G)

MGQVL RGTVT DFPGF DERAD AETLR KAMKG LGTDE ESILT LLTSR SNAQR QEISA AFKTL
FGRDL LDDLK SELTG KFEKL IVALM KPSRL YDAYE LKHAL KGAGT NEKVL TEIIA SRTPE
ELRAI KQVYE EEYGS SLEDD VVGDT SGYYQ RMLVV LLQAN RDPDA GIDEA QVEQD AQALF
QAGEL KWGTD EEKFI TIFGT RSVSH LRKVF DKYMT ISGFQ IEETI DRETS GNLEQ LLLAV
VKSIR SIPAY LAETL YYAMK GAGTD DHTLI RVMVS RSEID LFNIR KEFRK NFATS LYSMI
KGDTS GDYKK ALLLL CGEDD

XI Aminosäuresequenz von anxA5(A2R)

MRQVL RGTVT DFPGF DERAD AETLR KAMKG LGTDE ESILT LLTSR SNAQR QEISA AFKTL
FGRDL LDDLK SELTG KFEKL IVALM KPSRL YDAYE LKHAL KGAGT NEKVL TEIIA SRTPE
ELRAI KQVYE EEYGS SLEDD VVGDT SGYYQ RMLVV LLQAN RDPDA GIDEA QVEQD AQALF
QAGEL KWGTD EEKFI TIFGT RSVSH LRKVF DKYMT ISGFQ IEETI DRETS GNLEQ LLLAV
VKSIR SIPAY LAETL YYAMK GAGTD DHTLI RVMVS RSEID LFNIR KEFRK NFATS LYSMI
KGDTS GDYKK ALLLL CGEDD

Anhang B

Bei der Berechnung der Molmassen der Proteine wurde davon ausgegangen, dass sich alle Cysteinreste im reduzierten Zustand befinden. Außerdem wurde bei allen GFP-Mutanten und Varianten 20,02 Da für die Bildung des Chromophors abgezogen. Die Molmassen der Methioninanaloga betragen: $m_{Nle} = 131,17$ Da ($\Delta_{Met} = -18,04$ Da), $m_{Aha} = 144,13$ Da ($\Delta_{Met} = -5,08$ Da) und $m_{Cpa} = 129,16$ Da ($\Delta_{Met} = -20,05$ Da). Angegeben werden die mittleren Molmassen.

I Massenspektrometrische Analysen von eGFP und seinen Varianten

Protein	m_{ber} / Da	m_{ber} / Da nach NRE	m_{gef} / Da	NRE
eGFP	27974	27843	27843 (100 %)	+
Nle-eGFP	27866	27753	27753 (63 %) [5 × Nle]	+
			27771 (27 %) [4 × Nle]	+
			27789 (10 %) [3 × Nle]	+
Aha-eGFP	27944	27818	27821 (54 %) [4 × Aha]	+
			27842 (21 %) [0 × Aha]	+
			27950 (13 %) [5 × Aha]	—
			27974 (12 %) [0 × Aha]	—
Cpa-eGFP	27854	27743	27743 (51 %) [5 × Cpa]	+
			27762 (34 %) [4 × Cpa]	+
			27785 (15 %) [3 × Cpa]	+

II Massenspektrometrische Analysen von eGFP(G2A) und seinen Varianten

Protein	m_{ber} / Da	m_{ber} / Da nach NRE	m_{gef} / Da	NRE
eGFP(G2A)	27987	27856	27856	+
Nle-eGFP(G2A)	27879	27766	27767 (69 %) [5 × Nle]	+
			27785 (24 %) [4 × Nle]	+
			27804 (7 %) [3 × Nle]	+

Aha-eGFP(G2A)	27957	27831	27836 (72 %) [4 × Aha]	+
			27856 (28 %) [0 × Aha]	+
Cpa-eGFP(G2A)	27867	27756	27757 (62 %) [5 × Cpa]	+
			27778 (29 %) [4 × Cpa]	+
			27795 (9 %) [3 × Cpa]	+

III Massenspektrometrische Analysen von eGFP(G2R) und seinen Varianten

Protein	m_{ber} / Da	m_{ber} / Da nach NRE	m_{gef} / Da	NRE
eGFP(G2R)	28073	27942	28074	—

Die Variante Aha-eGFP(G2R) wurde ausschließlich in Form von Inclusion Bodies exprimiert, die nicht aufgereinigt wurden. Im Fall von Nle-eGFP(G2R) und Cpa-eGFP(G2R) konnten ebenfalls keine löslichen Proteine erhalten werden. Da in den entsprechenden SDS-Gelen aller Proben aber Banden auf der Höhe von eGFP detektiert wurden, wurden die Proben zur MALDI-MS-Analyse nach enzymatischem Verdau der Gelproben gegeben. Es liegen allerdings nicht genug Daten vor, um eine gesicherte Interpretation zu treffen.

IV Massenspektrometrische Analysen von anxA5 und seinen Varianten

Protein	m_{ber} / Da	m_{ber} / Da nach NRE	m_{gef} / Da	NRE
anxA5	35937	35806	35804	+
Aha-anxA5	35897	35771	35771 (86 %) [7 × Aha]	+
			35803 (14 %) [0 × Aha]	+

Die Varianten Nle-anxA5, und Cpa-anxA5 konnten auf Grund ihrer starken Aggregations-tendenz nicht mittels ESI-MS untersucht werden. MALDI-MS-Analysen nach enzymati-schem Verdau von Gelproben ergaben hingegen nicht genügend gesichertes Material, um eine Aussage hinsichtlich des Einbaugrades und der N-terminalen Prozessierung zu treffen.

V Massenspektrometrische Analysen von anxA5(A2G) und seinen Varianten

Protein	m_{ber} / Da	m_{ber} / Da nach NRE	m_{gef} / Da	NRE
anxA5(A2G)	35923	35792	35792	+
Aha-anxA5(A2G)	35883	35757	35883 (16 %) [8 × Aha]	—
			35791 (40 %) [0 × Aha]	+
			35757 (44 %) [7 × Aha]	+

Die Varianten Nle-anxA5(A2G) und Cpa-anxA5(A2G) konnten auf Grund ihrer starken Aggregationstendenz nicht mittels ESI-MS untersucht werden. MALDI-MS-Analysen nach enzymatischem Verdau von Gelproben ergaben hingegen nicht genügend gesichertes Material, um eine Aussage hinsichtlich des Einbaugrades und der N-terminalen Prozessierung zu treffen.

VI Massenspektrometrische Analysen von anxA5(A2R) und seinen Varianten

Protein	m_{ber} / Da	m_{ber} / Da nach NRE	m_{gef} / Da	NRE
anxA5(A2R)	36022	35891	36021	—
Aha-anxA5(A2R)	35982	35856	36023 (14 %) [0 × Aha]	—
			35980 (86 %) [8 × Aha]	—

Die Varianten Nle-anxA5(A2R) und Cpa-anxA5(A2R) konnten auf Grund ihrer starken Aggregationstendenz nicht mittels ESI-MS untersucht werden. MALDI-MS-Analysen nach enzymatischem Verdau von Gelproben ergaben hingegen nicht genügend gesichertes Material, um eine Aussage hinsichtlich des Einbaugrades und der N-terminalen Prozessierung zu treffen.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Nediljko Budisa für die Überlassung des spannenden Themas, dessen Bearbeitung er mit viel Interesse und Diskussionsbereitschaft verfolgt hat. Außerdem danke ich ihm für die geduldigen Erklärungen biologischer Zusammenhänge und die vielen interessanten Gespräche nichtfachlicher Natur.

Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner und Herrn Prof. Dr. Thomas Kiefhaber danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Luis Moroder für die Bereitstellung eines chemischen Arbeitsplatzes und seine stete Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. Stephan Uebel möchte ich ebenfalls für die Bereitstellung eines Arbeits- und Schreibplatzes danken sowie Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Christian Klein (Heidelberg) danke ich für die Bereitstellung von *EcMetAP*, Herrn Prof. Dr. Valentin Wittmann und Herrn Henning Beckmann (beide Konstanz) für die Synthesen der alkinfunktionalisierten Kohlenhydrate sowie für die Durchführung der SPR-Experimente. Herrn PD Dr. Ralph Golbik (Halle) danke ich für die zur Verfügung gestellte Barnase. Frau Dr. Barbara Mulinacci danke ich für die Durchführung der ELISA-Experimente. Der Firma CHIRALIX (Nijmegen, Niederlande) danke ich für die kostenlose Bereitstellung von L-Hpg.

Frau Elisabeth „Lissy“ Weyher-Stingl gebührt großer Dank für ihre Unterstützung bei allen analytischen Verfahren, vor allem aber bei den massenspektrometrischen Analysen. Durch ihr Wissen und ihre Erfahrung hat sie großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch recht herzlich bei Herrn Hans-Jürgen Musiol bedanken, der stets ein offenes Ohr für meine chemischen und synthetischen Fragen hatte und nie um die richtige Antwort sowie die entsprechende Literaturstelle verlegen war. Herrn Dr. Frank Siedler und Frau Sigrid „Siggi“ Bauer danke ich für die MALDI-Analysen der Proteinproben.

Bei Frau Dr. Birgit Wiltschi, Frau Sandra „Schatz“ Lepthien und Frau Gudrun Reimann bedanke ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und ihre wertvollen Hinweise.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Budisa danke ich für die anregenden Diskussionen, die zahlreichen praktischen Tipps und die einmalige Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Frau Waltraud „Traudl“ Wenger, Frau Petra „P“ Birle und Frau Tatjana „T“ Krywcun für ihre geduldige Beantwortung meiner Fragen, die Einführung in die biologischen Arbeitstechniken sowie für das Überlassen des einen oder anderen Puffers, die Unterstützung bei der täglichen Arbeit und die Plasmidkonstruktionen.

Frau Sandra „Schatz“ Lepthien und Frau Christina „Schnecke“ Wolschner danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung im Labor sowie für manches lustige Erlebnis – ich bin immer noch der Meinung, dass wir den Karaokewettbewerb gewonnen haben . . .

Herrn Michael „Michi“ Hösl danke ich für seine Hilfsbereitschaft, die gute Musik im Labor und die sportlichen Stunden nach der Arbeit. Bei Herrn Dr. Yuri Cheburkin bedanke ich mich für seine Unterstützung bei der Expression der EGF-Mutanten und Varianten.

Frau Dr. Ulrike „Ulli“ Kusebauch danke ich für die tolle Atmosphäre im chemischen Labor und so manchen kleinen „Ratsch“ zwischendurch. Bei Herrn Dr. Sergio Cadamuro bedanke ich mich für die kompetente Anleitung zur Durchführung von NMR-Messungen (das Befüllen des Spektrometers mit Stickstoff und Helium wird mir noch lange im Gedächtnis bleiben) sowie für die Freundschaft, die aus unserer gemeinsamen Zeit am MPI entstanden ist. Herrn Dr. Cyril Boulegue danke ich für seine Hilfe bei all meinen Problemen mit den HPLC-Systemen und dem Peptide Synthesizer sowie die lockere Büroatmosphäre. Dass ich mich auch an meinem zweiten Schreibtisch wohlfühlte habe, ist Frau Mirit Kolog-Gulko zu verdanken, die über die Jahre zu einer guten Freundin geworden ist.

Bei Herrn Dr. Jan Namyslo (Claustahl) möchte ich mich für die Messung von NMR-Spektren bedanken. Leider hat das entsprechende Projekt keinen Eingang in diese Arbeit gefunden.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Studenten/innen – und hier besonders bei Frau Dorothea Matschkal und Frau Anna-Skrollan Geiermann –, die im Rahmen ihrer Praktika, Bachelor- bzw. Masterarbeit ihren Beitrag zum Fortgang der Arbeiten geleistet haben.

Bei Frau Petra Weltzer, Frau Dr. Antje Gebel und Herrn Dr. Kai Schmidt möchte ich mich für die tiefe Freundschaft bedanken. Diese und die Tatsache, dass sie immer für mich da gewesen sind, haben mir oft weitergeholfen.

Bei Frau Ani Asvazadurian, Frau Manuela „Manü“ Böhm, Frau Amy Cummins, Herrn Dr. Darius „Jimmy“ Dragolea, Frau Anne Schmalfuß, Herrn Dr. Jean-Frédéric Castagnet, Frau Christina Wende, Herrn Ralf Bode, Herrn Emanuel „Ede“ Pöhls und Herrn Dr. Heinz Christian „Heinzi“ Rost danke ich für die Freundschaft und die abwechslungsreiche Freizeitgestaltung.

Bei allen Mitspielern der Theatergruppe „Raumnot“ und dem ehemaligen Spielleiter Herrn Stefan Keulen-Kromes bedanke ich mich für die vielen kreativen Stunden und die entstandenen Freundschaften.

Der größte Dank gebührt aber meinen Eltern, Thomas und Peggy, Marko und Katja sowie Isabell, Jonathan, Lea, Lana, meiner Oma Melitta und ganz besonders Ervil. Ihnen danke ich von ganzem Herzen für ihre bedingungslose Liebe und dafür, dass sie stets für mich da gewesen sind und mir den Rücken gestärkt haben.