



Proteintemplat-katalysierte Reaktionen von Peptidliganden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

von

M. Sc. Nicolas Brauckhoff

Dekanin

Prof. Dr. Insa Melle

Gutachter

1. Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Dr. Tom N. Grossmann

Bei dieser Veröffentlichung handelt es sich um eine Dissertation der Fakultät Chemie und
Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Chemische Biologie von Prof. Dr. Herbert Waldmann in der Arbeitsgruppe von Dr. Tom N. Grossmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und am *Chemical Genomics Centre of the Max Planck Society* von Oktober 2011 bis Juli 2015 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Beitrag veröffentlicht:

Protein-Templated Peptide Ligation

N. Brauckhoff, G. Hahne, T.-H. Yeh, T. N. Grossmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4337 – 4340; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4425 – 4429

Eingereicht am: 21.07.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2015

Für meinen Sohn Jan

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Kovalente Modifikation von Proteinen	4
1.2 Ligand-dirigierte Modifikation von Proteinen	8
1.3 Peptid-/Protein-vermittelte Reaktionen	14
1.4 Das KIX-TAD-pKID-Modellsystem	16
2 Zielsetzung	21
3 Ergebnisse und Diskussion	23
3.1 Versuche zu Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktionen	24
3.2 Versuche zur Templat-vermittelten Transferreaktion	57
4 Zusammenfassung und Ausblick	75
4.1 Zusammenfassung	75
4.2 Ausblick	80
5 Material und Methoden	81
5.1 Vektoren, Mikroorganismen und Enzyme	81
5.2 Stammlösungen, Nährmedien und Additive	82
5.3 Analytische Methoden	85
5.4 Gentechnische Methoden	95
5.5 Zellbiologische Methoden	108
5.6 Methoden zur Proteinaufreinigung	112
5.7 Synthesen von Reportergruppen (F)	115

5.8	Manuelle Festphasensynthese von Peptiden	116
5.9	Automatisierte Festphasensynthese von Peptiden	122
5.10	Verfolgung von Reaktionsverläufen	123
6	Abkürzungen und Akronyme	131
7	Literaturverzeichnis	136
8	Danksagung	150
9	Anhang	152
9.1	Primersequenzen	152
9.2	gBlock-Sequenzen	153
9.3	Gensequenzen	154
9.4	Generierte Proteinsequenzen und deren Parameter	155
9.5	Vektorkarten	158
9.6	Sequenzierungsergebnisse	164
9.7	HPLC-MS-Analytik der erstellten Peptidvarianten	167
9.8	HPLC-MS-Analytik der Reportergruppe F	175
9.9	Rohdaten zu den Verknüpfungs- und Transferversuchen	176

Kurzzusammenfassung

Molekulare Template erlauben die Vororientierung gewünschter Reaktanten und erhöhen deren effektive Konzentration,^[1] wodurch die Bildung korrespondierender Produkte beschleunigt wird. Innerhalb der heutigen Forschung spielen Templat-unterstützte Reaktionen eine wichtige Rolle und kommen bei der Bearbeitung diverser biochemischer Fragestellungen zum Einsatz.^[2-9] Insbesondere handelt es sich dabei um Nukleinsäure-vermittelte Reaktionen, wohingegen enzymatisch inaktive Proteindomänen bisher kaum verwendet wurden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem zur selektiven Verknüpfung zweier Peptidliganden (**A** und **B**) unter Verwendung eines Proteintemplats **T** erstellt. Dabei binden **A** und **B** kooperativ an **T** und bilden einen trimären Komplex (**A·T·B**). Beide Peptide wurden *N*-terminal mit reaktiven Gruppen ausgestattet, die bei korrekter Orientierung eine Nachbarschafts-induzierte Umsetzung zum Verknüpfungsprodukt ermöglichen. Die untersuchten Reaktionen zeigten hohe Templat-bedingte Beschleunigungen ($\alpha > 140$), wobei ein Maleimid-modifiziertes Peptid ($\alpha = 6200$) sämtliche bekannten Reaktionsbeschleunigungen Templat-basierter Peptidverknüpfungen übertraf ($\alpha = 81 - 1800$).^[10-12] Aufgrund der hohen Reaktionsraten und -spezifitäten wurde das Modellsystem bereits erfolgreich zur selektiven Markierung eines Zielproteins innerhalb zellulären Lysats eingesetzt.^[13]

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Austauschrate der Produkte und Edukte am Templat erhöht, indem eine Transferreaktion statt einer Verknüpfung eingesetzt wurde. Mit dem Wissen um die hohe Chemo-selektivität und Effizienz der nativen chemischen Ligation^[14-15] konnte das Modellsystem derart modifiziert werden, dass ein Templat-vermittelter Transfer einer Reportergruppe (**F**) von einem Donor- **D** auf den Akzeptorligand **A** möglich war. Unter Verwendung eines am Akzeptor befindlichen Fluoreszenzlöschers konnte der Transfer von **F** in Echtzeit verfolgt werden. Dies erlaubt eine katalytische Reaktionsführung mit bis zu 5 Umsetzungen pro Templatmolekül. Final wurde das Konzept erfolgreich zur spezifischen Markierung eines Zielproteins verwendet.

Abstract

Molecular templates are often used for the specific pre-orientation of reactants to increase their effective concentrations and thereby accelerate the desired reaction.^[1] Today, the concept of templated reactions has already been applied to a multitude of chemical problems including self-replicating peptides^[2-5] and nucleic acids^[6-7] and the generation of DNA-based^[8] or dynamic combinatorial compound libraries.^[9] So far applications of templated reactions for a use within biological environments and the selective labeling of entire proteins are not known.

In the first part of this doctoral thesis a protein-templated peptide ligation has been designed involving the selective coupling of two peptides (**A** and **B**) by the use of a protein template **T**. The two peptide ligands **A** and **B** cooperatively bind to **T** resulting in the formation of the trimeric complex **A•T•B**. Both peptides were modified with appropriate reactive groups allowing proximity-induced ligations. The reactions exhibit magnificent rate accelerations ($\alpha > 140$) with a maleimide-derivatized peptide ($\alpha = 6200$) overtop accelerations of known ligations that use foldamers, peptides or nucleic acids as matrices ($\alpha = 81 - 1800$).^[10-12] The protein-templated peptide ligation model shows high reaction rates and template specificity and has proven useful for the selective labeling of a protein in crude cell lysate.^[13]

In the second part this dissertation product inhibition caused by the ligation reaction has been reduced by the utilization of a transfer reaction. Taking advantage of the selectivity and efficiency of the native chemical ligation^[14-15] a donor peptide **D** and an acceptor peptide **A** were composed. For measuring the template-mediated transfer reaction in real time, a convenient fluorescent label **F** has been designed which was transferred from **D** to a quencher molecule (**Q**) containing variant of **A**. By measuring the fluorescence decay caused by the transfer of **F** to the vicinity of **Q**, the protein-templated transfer system **A•T•D** generates up to five catalytic turn over. Finally the templated transfer reaction has been successfully applied for the specific labeling of a desired protein.

1 Einleitung

Die Steuerung der Selektivität und Geschwindigkeit chemischer Reaktionen gilt seit jeher als besondere Herausforderung innerhalb der Naturwissenschaften. In der konventionellen Synthesechemie werden meist hohe Konzentrationen an Edukten zur Gewährleistung einer effizienten Bildung gewünschter Reaktionsprodukte eingesetzt. Ein gänzlich anderer Ansatz lässt sich im Bereich biologischer Systeme beobachten. Dort werden Edukte, die in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, spezifisch von Biomakromolekülen erkannt und selektiv umgesetzt. Diese makromolekularen Template binden die entsprechenden Reaktionspartner und erhöhen deren effektive Konzentration, wodurch bei korrekter Ausrichtung der involvierten funktionellen Gruppen eine spezifische und effiziente Produktbildung erfolgen kann. Auf diese Weise ist die Koexistenz einer Vielzahl reaktiver Verbindungen möglich, ohne dass diese willkürliche Nebenreaktionen eingehen,^[1] da bei derart niedrigen Konzentrationen Templat-unvermittelte Konkurrenzreaktionen nur sehr langsam verlaufen.^[16]

Das Konzept Templat-vermittelter Reaktionen führt bis in die Anfänge der Entstehung des Lebens zurück.^[17] Die molekulare Evolution zur Selbstorganisation makromolekularer Verbindungen, wie DNA, RNA, Enzyme und die Emergenz von Leben, konnten nicht auf spontane und willkürliche Weise im Sinne einer Abiogenese^[18] vollzogen werden.^[19] Wie genau diese Entwicklung von prebiotischen Prozessen bis hin zur späteren Biogenese stattgefunden hat, ist noch immer nicht bekannt. Eine Vielzahl der vorgeschlagenen Modelle enthalten jedoch frühe Formen Matrix-gestützter Prozesse.^[7, 20-27] Ein wahrscheinlicher Ansatz ist innerhalb der prebiotischen, chemischen Evolution zu finden, in der Vorläufermoleküle eine primitive Version Templat-vermittelter Prozesse ausübten, um basierend darauf komplexere Strukturen zu generieren.^[22, 27-37] So wurde u. a. postuliert, dass innerhalb einer möglichen frühen RNA-basierten Welt^[17, 38] autokatalytische RNA-Sequenzen, sogenannte Ribozyme, eine mögliche Schnittstelle für den Übergang zu biotischen Daseinsformen darstellten.^[39-40] Diese aktiven RNA-Sequenzen sind in der Lage, chemische Reaktionen zu katalysieren, in denen sie gleichzeitig sowohl als

Informationsträger als auch als Templat fungieren.^[41-42] Weiterhin legen Studien u. a. von Gilham^[26] und Orgel^[43] nahe, dass Oligonukleotide als mögliche Template zur vermittelten Ligation komplementärer Stränge gedient haben könnten, aus denen so eventuell die heutige Form der DNA-Helix hervorging.^[16] Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass Peptide unter gewissen Umständen zur autokatalytischen Selbstreplikation in der Lage sind, indem sie als eigene Matrize dienen,^[2-5, 44] was die Theorie zur Templat-vermittelten Entstehung von Leben weiterhin unterstützt. Evolutiv optimierte und Templat-vermittelte Prozesse, wie die Replikation, Transkription und Translation sowie diverse Signaltransduktionskaskaden lassen dieses Prinzip im Rahmen der Evolutionstheorie als potentes Konzept erscheinen.^[1]

Innerhalb der heutigen Forschung spielen Templat-unterstützte Reaktionen eine wichtige Rolle und wurden bereits auf eine Vielzahl biochemischer Fragestellungen angewendet. Beispiele dafür sind selbstreplizierende Peptide^[2-5] und Nukleinsäuren,^[6-7] die Generierung DNA-basierter^[8] oder dynamisch-kombinatorischer Substanzbibliotheken^[9] sowie Verfahren zum Nachweis von Proteinen^[45] und Nukleinsäuren.^[46-47] Ein weiteres interessantes Feld für den Einsatz Templat-vermittelter Reaktionen ist die kovalente Modifikation von Proteinen.

1.1 Kovalente Modifikation von Proteinen

Die kovalente Modifikation von Proteinen erfolgt häufig über nukleophile, im Zielprotein (POI, *protein of interest*) adressierbare Aminosäuren innerhalb einer Biokonjugationsreaktion (Abbildung 1). Allerdings ist hierbei die Auswahl adressierbarer Reste, bedingt durch die limitierte Anzahl nukleophiler proteinogener Aminosäuren, begrenzt.

Cystein (1) ist mit einer Thiol-Seitenkette aufgrund der hohen Nukleophilie des Schwefels und des verhältnismäßig seltenen Vorkommens in Proteinen ein sehr attraktives Ziel zur selektiven Biokonjugation.^[48] Dabei reagieren Cysteine u. a. mit Michaelakzeptoren(2, 4),^[49-50] α -Halogenketonen (6)^[50-51] sowie Epoxiden (8)^[48] (Abbildung 1a). Historisch sind die PEGylierung und Fluoreszenzmarkierung von Verbindungen mittels Cystein unter Einsatz von Maleimiden (2) oder Disulfiden (14, 15)^[52] prominente Beispiele der Biokonjugation.^[53-54] Die PEGylierung dient insbesondere der Erhöhung der Löslichkeit

sowie der Stabilität gegenüber metabolischen Enzymen.^[55] Weiterhin wurde eine aus zwei Schritten bestehende Modifikation von Cysteinen zur späteren Nutzung innerhalb einer Michaeladdition^[56] oder Kreuzmetathese olefinischer Verbindungen beschrieben (10 – 13).^[57]

Primäre Amine (17, 34) stellen eine weitere Option zur biokompatiblen Modifikation dar. Lysine (17) beispielsweise sind häufig auf Proteinoberflächen vertreten und reagieren üblicherweise bereits unter physiologischen Bedingungen^[58-60] mit Estern (18), Sulfonylchloriden (20), Isocyanaten (22) und Isothiocyanaten (24) zu den korrespondierenden Produkten (Abbildung 1b).^[48] Weitere Beispiele zur kovalenten Modifikation von Lysin beinhalten die reduktive Alkylierung mittels Iridium-katalysierter Hydrogenierung (26 – 29),^[61] die Verwendung einer 6π -Aza-Elektrozyklisierung (30),^[58] sowie die *N*-terminale Modifikation eines Proteins via Transaminierung (35 – 38). Letzteres setzt voraus, dass die *N*-terminale Aminosäure aus Aspartat oder Glutamat (34) besteht.^[62] Innerhalb dieser Reaktionen zur Modifikation von Lysin können jedoch auch die primären Amine der Protein-*N*-Termini reagieren.^[48]

Aus dem Ensemble potentiell nukleophiler Funktionen, die in natürlichen Aminosäuren adressiert werden können, stellen Alkohole (39), nach Thiolen als nukleophilste Gruppe und den darauf folgenden primären Aminen, die Option mit der geringsten Reaktivität dar. Dennoch können diese unter definierten Bedingungen zur Reaktion gebracht werden. Beispiele dafür beinhalten die intermolekulare oxidative Kupplung von Tyrosinresten zur Verknüpfung zweier Proteine mittels Ruthenium(II)-Katalysator (40),^[63-64] eine Modifikation von Tyrosin auf der Basis der Mannich-Reaktion mit Aldehyden und Anilinen (42, 43)^[65-66] sowie die Verwendung eines π -Allyl-Palladiumkomplexes (45)^[67] (Abbildung 1c).

Eine Besonderheit stellen Tryptophanreste (47) dar, die u. a. selektiv mittels Rhodium-Carbenoid (48) adressiert werden können.^[68-69] Dies erscheint vor dem Hintergrund, dass Tryptophan die seltenste proteinogene Aminosäure ist,^[48] sehr attraktiv (Abbildung 1d).

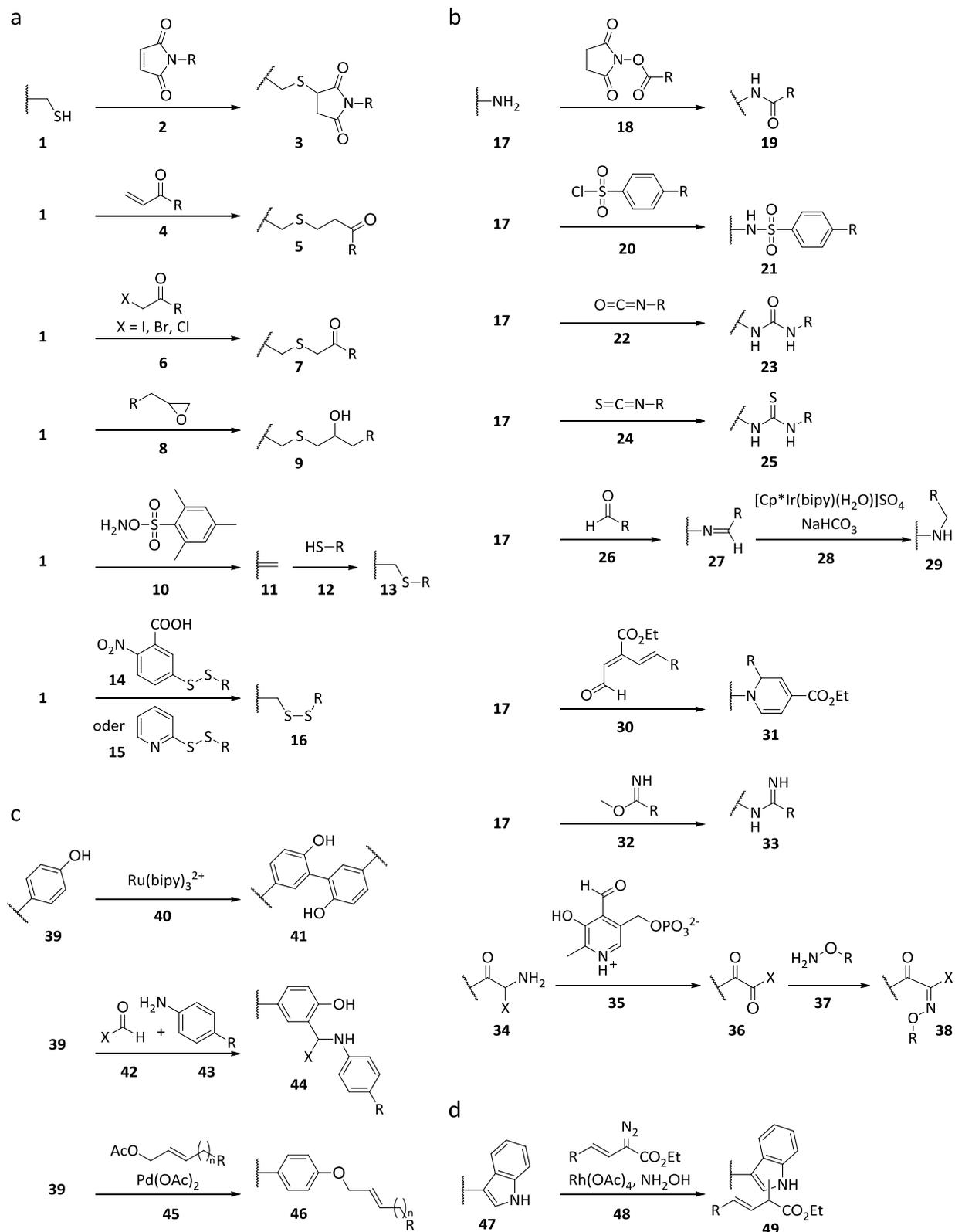


Abbildung 1: Beispiele elektrophiler Gruppen zur chemischen Modifikation natürlicher Aminosäuren. a) Cystein (1), b) Lysin (17) sowie primäre Amine (17, 34), c) Tyrosin (39) und d) Tryptophan (47); Cp* = C₅Me₅, bipy = 2,2'-Bipyridin.

Ein Nachteil der chemoselektiven Adressierung proteinogener Aminosäuren ist das relativ hohe Aufkommen entsprechender Aminosäurereste. Dabei ist gelegentlich die zielgerichtete Adressierung einer expliziten Aminosäure innerhalb einer komplexen Komposition verschiedener nukleophiler Reste notwendig (Abbildung 2). Eine Möglichkeit, dieses Selektivitätsproblem zu umgehen, stellt der Einsatz bioorthogonaler Reaktionen dar.^[70-75] Zur Modifikation des POIs mit einer bioorthogonalen reaktiven Gruppe, wie einem Azid, Alkin oder Keton, sind besondere und zum Teil aufwendige Methoden notwendig, was deren Anwendbarkeit deutlich einschränkt.^[48, 74, 76-77]

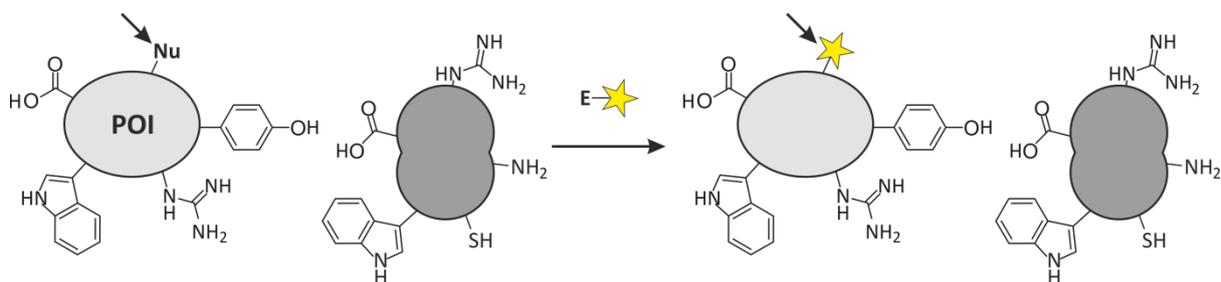


Abbildung 2: Selektive Markierung eines Aminosäurerestes in Gegenwart konkurrierender nukleophiler Gruppen; **E** = elektrophile Sonde, gelber Stern = Reportergruppe, **Nu** = Zielnukleophil, POI = Zielprotein.

Alternativen zur selektiven und kovalenten Markierung von Zielproteinen bieten häufig enzymatische oder Enzym-basierte Transformationen. Bei der enzymatischen Markierung werden Gensequenzen, welche meist für kurze Peptide oder kleine Proteindomänen kodieren, als Enzymsubstrat gentechnisch an das Zielprotein fusioniert. Durch die Enzymvermittelte Reaktion können die Zielproteine selektiv und spezifisch mit der gewünschten Verbindung modifiziert werden (Abbildung 3). Beispiele beinhalten den Einsatz von Biotin-Ligase,^[78-81] Liponsäure-Ligase,^[82-84] Sortase^[85-88] und den Transferasen Sfp, AcpS^[89] oder NMT^[90].

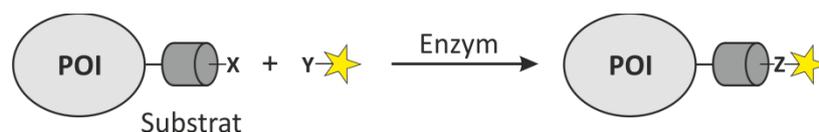


Abbildung 3: Enzymatische Modifikation von Zielproteinen mittels Substratsequenz; gelber Stern = Reportergruppe, POI = Zielprotein, Substrat = dunkelgraue Faszstruktur, **X** und **Y** = reaktive Gruppen, **Z** = Verknüpfungsrest.

Bei den selbst-modifizierenden Sequenzen werden Enzym-abgeleitete Domänen an das Zielprotein fusioniert. Dabei sind die Enzyme genetisch derart modifiziert, dass sie die reguläre enzymatische Transformation vornehmen, ohne jedoch das Substrat final aus dem aktiven Zentrum (AZ) zu entlassen. Stattdessen wird eine kovalente Bindung zum Substrat hergestellt, wodurch das Substrat nach dem Prinzip einer irreversiblen Enzyminhibition im AZ verbleibt (Abbildung 4). Bekannte Beispiele dafür sind SNAP-Tag,^[91-92] CLIP-Tag,^[93-94] Halo-Tag^[95] und Cutinase-Tag.^[96]

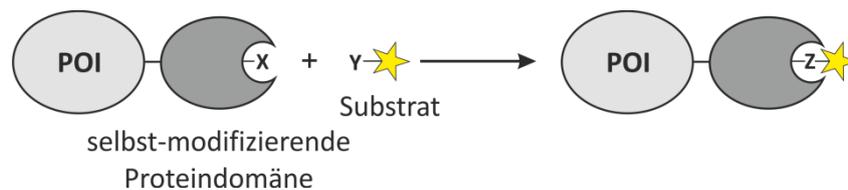


Abbildung 4: Enzym-basierte Modifikation von Zielproteinen mittels markierten Substrats; Enzym = dunkelgraue Struktur, gelber Stern = Reportergruppe, POI = Zielprotein, X und Y = reaktive Gruppen, Z = Verknüpfungsrest.

Neben dem Vorteil der selektiven Markierung des Zielproteins sind durchaus Nachteile vorhanden. So wird stets ein geeignetes Enzym-Substrat-Paar benötigt. Zudem sind oftmals aufwendige genetische Modifikationen des Enzyms notwendig, um die kovalente Bindung zum Substrat anstelle der eigentlichen katalytischen Reaktion realisieren zu können. Des Weiteren können Fusionsfragmente großen molekularen Massenzunahmen von ca. 20 – 30 kDa entsprechen,^[48] was einen eminenten Einfluss auf die native Faltung sowie die bioaktive Funktionalität des Zielproteins bedeuten kann.^[97]

1.2 Ligand-dirigierte Modifikation von Proteinen

Eine Alternative zu den Enzym-basierten Methoden bieten Ligand-dirigierte Reaktionen. Dabei bindet der Ligand, der häufig einer niedermolekularen Verbindung (sm, *small molecule*) oder einem Peptid entspricht, selektiv an das Zielprotein. Anschließend kann eine im Ligand enthaltene reaktive Gruppe (R) mit Oberflächen-exponierten Aminosäuren (As₁ und As₂) eine kovalente Bindung eingehen, wodurch eine irreversible Markierung erfolgt (Abbildung 5a).

1.2.1 Photoaffinitäts-basierte Modifikation

Eine Möglichkeit, die Verknüpfungsreaktion in gewissem Maße zeitlich steuern zu können, bietet das Prinzip der Photoaffinitäts-basierten Modifikation von Zielproteinen.^[98] Hierbei binden die Zielproteine zunächst den jeweiligen Liganden. Anschließend kann unter dem Einsatz von am Ligand befindlichen photoreaktiven Funktionen, wie z. B. Diazirinen,^[99-104] Benzophenonen^[105-109] oder Arylaziden^[110-113], die Verknüpfungsreaktion an räumlich nahe Aminosäuren mittels UV-Bestrahlung initiiert werden (Abbildung 5b – d).^[114-116] Dieses Prinzip wurde 1962 erstmalig verwendet^[117] und wird häufig für die Identifizierung von Proteinrezeptoren kleiner Moleküle eingesetzt.^[114, 118-122] Diese Methode ist jedoch nicht zur selektiven Markierung eines Proteins geeignet, da innerhalb der Verknüpfungsreaktion unspezifisch in direkter Nachbarschaft befindliche Aminosäuren adressiert werden. Zudem ist die Markierungseffizienz aufgrund kurzer Lebenszeit der entstehenden Carben- und Nitrenspezies gering.^[48]

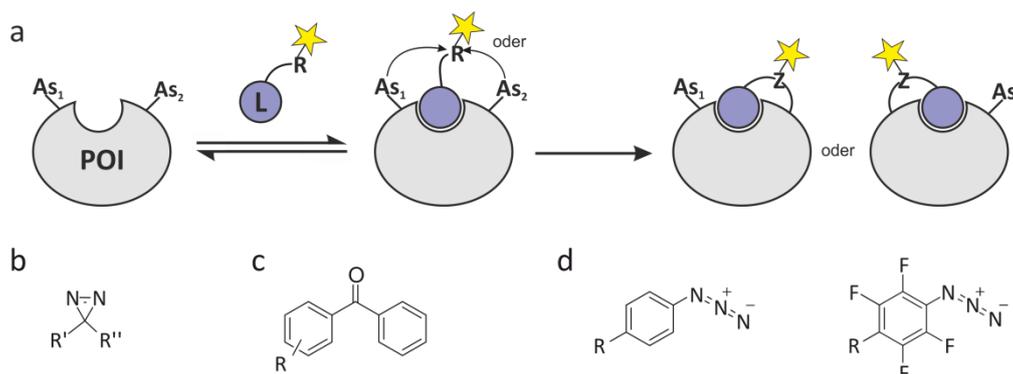


Abbildung 5: a) Ligand-dirigierte Modifikation von Proteinen mittels Photoaffinitäts-basierter Biokonjugation. b) Diazirine, c) Benzophenone und d) (halogenierte) Arylazide; **As₁** und **As₂** = reaktive Aminosäuren, gelber Stern = Reportergruppe, **L** = Ligand, **POI** = Zielprotein, **R** = reaktive Gruppe, **Z** = Verknüpfungsrest.

1.2.2 Ligations-basierte Modifikation

Eine selektivere Methode zur Ligand-basierten Proteinmodifikation bietet der Einsatz von elektrophil (**E**) modifizierten Liganden (**L**), die lediglich mit einem einzigen nukleophilen Aminosäurerest (**Nu**) reagieren, der sich in räumlicher Nähe zur Ligandenbindungsstelle befindet (Abbildung 6 sowie Tabelle 1). Auf diese Weise findet eine Nachbarschafts-dirigierte (*proximity induced*) Transformation statt, in der die nukleophile Gruppe bedingt durch die effektive Konzentration eine kovalente Verknüpfungsreaktion zum Liganden

eingeht, ohne mit anderen reaktiven Gruppen zu konkurrieren. Dieses Prinzip wurde bereits erfolgreich zur Modifikation diverser Zielproteine verwendet. Im Folgenden soll auf die verwendeten elektrophilen Verbindungen näher eingegangen werden.

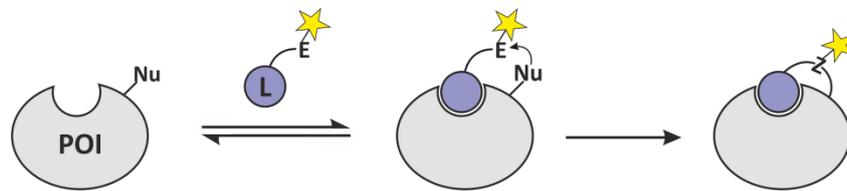


Abbildung 6: Ligand-dirigierte Verknüpfungsreaktion zur kovalenten Modifikation von Proteinen; E = elektrophile Gruppe, gelber Stern = Reportergruppe, L = Ligand, Nu = nukleophile Aminosäure, POI = Zielprotein, Z = Verknüpfungsrest.

Acrylsäuren

Eine mit Cystein mutierte Dihydrofolatreduktase eDHFR(L28C) wurde auf Basis eines Acrylsäure-modifizierten Liganden selektiv adressiert.^[123]

Aldehyde

Eine kovalente, reversible Variante der Peptid-dirigierten Proteinmodifikation wurde im Jahr 2007 unter dem Einsatz eines Aldehyds erreicht, der als elektrophile Gruppe durch Ausbildung einer Schiff'schen Base an ein Lysin des Zielproteins bindet (Abbildung 7a).^[124]

Asparagin und Asparaginsäure

Peptidliganden, die mit Asparagin^[125-126] oder Asparaginsäure^[127] modifiziert wurden, konnten selektiv an das jeweilige Zielprotein binden, indem sie mit nahegelegenen Lysinresten eine Isopeptidbindung ausbildeten (Abbildung 7b).

β -Lactame

Im Jahr 2009 wurde die Markierung einer Lactamase beschrieben, die, bedingt durch eine Mutation des katalytischen Zentrums, ein markiertes β -Lactam-Substrat irreversibel über die Alkoholfunktion einer Serinseitenkette bindet (Abbildung 7c).^[128]

Chloressigsäuren

Bekannte Beispiele für Chloressigsäure-modifizierte Peptide beinhalten die selektive Modifikation eines VEGF(vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)-Rezeptors mittels Cystein^[129-132] oder Lysin.^[133]

Dinitrofluorbenzole

Dinitrofluorbenzol-derivatisierte Peptidliganden stellen eine zusätzliche bekannte Alternative zur kovalenten Adressierung eines VEGF-Membranrezeptors mithilfe eines Lysinrests dar (Abbildung 7d).^[133]

Epoxide

Epoxide sind eine weitere Gruppe elektrophil reagierender Gruppen, die in Ligationsreaktionen Verwendung finden. So wurde die Histidin-enthaltende Anhydrase (hCAII) bereits mit einem Epoxid-tragenden Molekül mittels Verknüpfungsreaktion umgesetzt.^[134-135]

Maleimide

Im Jahr 2004 wurde ein auf einem Azobenzol basiertes Photo-aktivierbares Schaltermolekül zur reversiblen Kontrolle eines K⁺-Ionenkanals beschrieben.^[136] Hierzu wurde ein am Ligand befindliches Maleimid kovalent mit einem Cysteinrest des Zielproteins verknüpft. Ein weiteres Beispiel zur Ligand-basierten selektiven Modifikation wurde unter der Verwendung eines Maleinsäure-derivatisierten Peptidliganden publiziert (Abbildung 7e).^[133] Als nukleophile Einheit diente eine Lysinseitenkette eines VEGF-Rezeptors.

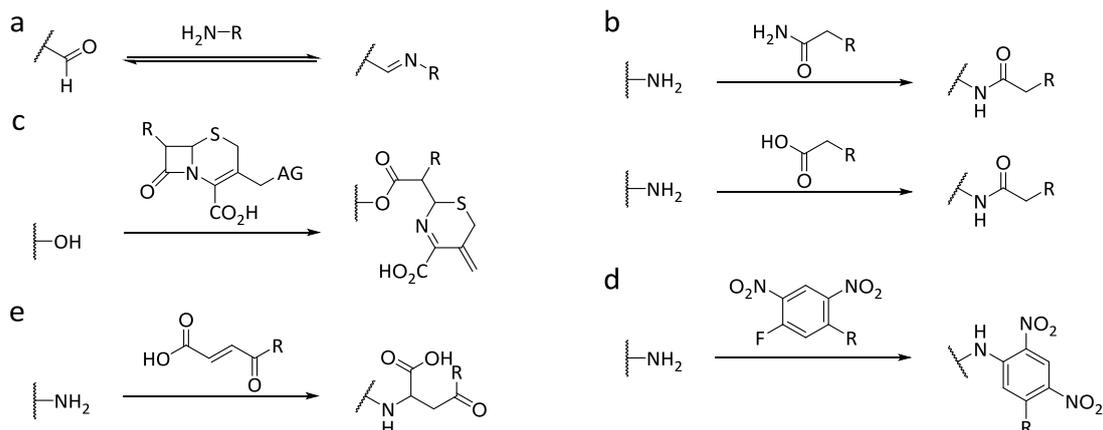


Abbildung 7: Beispiele elektrophiler Verbindungen zur Ligations-basierten Modifikation von Proteinen. a) Aldehyd, b) Asparagin und Asparaginsäure c) β-Lactam-Derivat, d) Dinitrofluorbenzol und e) Maleimid-Derivat; AG = Abgangsgruppe, R = organischer Rest.

Tabelle 1: Elektrophile Verbindungen zur Ligand-basierten kovalenten Modifikation von Proteinen; sm = niedermolekulare Verbindung (*small molecule*).

Elektrophil	Zielproteine	Nukleophil	Ligand	Literaturquelle
Acrylsäuren	eDHFR(L28C)	Cystein	sm	[123]
Aldehyde	HLA-DQ2, Transglutaminase 2	Lysin	Peptid	[124]
Asparagin	Pilin	Lysin	Peptid	[125-126]
Asparaginsäure	FbaB	Lysin	Peptid	[127]
β-Lactame	Lactamase	Serin	sm	[128]
Chloressigsäure	PDZ, SH3, EGFP, GPCR	Cystein	Peptid	[129-132]
Chloressigsäure	VEGF-Rezeptor	Lysin	Peptid	[133]
Dinitrofluorbenzole	VEGF-Rezeptor	Lysin	Peptid	[133]
Epoxide	hCAII	Histidin	sm	[134-135]
Maleimid	K ⁺ -Ionenkanal	Cystein	sm	[136]
Maleimid	VEGF-Rezeptor	Lysin	Peptid	[133]

Besitzt das Zielprotein von Grund auf keine nukleophile Aminosäurefunktion in unmittelbarer Nähe zur Bindungsstelle, so kann diese mittels einer geeigneten Mutationsstrategie eingeführt werden. Trotz der Möglichkeit zur selektiven Markierung von Proteinen ist die Verwendung von Verknüpfungsreaktionen mit Nachteilen verbunden. So können aus der kovalenten Bindung der Liganden signifikante Massenzunahmen des markierten Proteins resultieren. Überdies ist die Ligandenbindungsstelle irreversibel besetzt, wodurch das Zielprotein oft bezüglich seiner endogenen Funktion inaktiviert wird.^[48] Tatsächlich sind die Konsequenzen kovalenter Modifikationen *a priori* schwer absehbar und können *in vivo* unter Umständen Immunantworten verursachen.^[137] Für

spätere Aktivitätsstudien ist die bioaktive Funktionalität eines Zielproteins jedoch essentiell, wodurch die Applikation dieser Methoden meist auf artifizielle Systeme limitiert ist.

1.2.3 Transfer-basierte Modifikation

Ansätze, in denen die selektive Markierung mithilfe einer Transferreaktion statt einer Verknüpfung erfolgt, stellen eine weitere Option der Ligand-dirigierten Modifikation von Proteinen dar. Hierzu bindet der Ligand (L) selektiv an das Zielprotein. Anschließend greift ein in Nachbarschaft stehender nukleophiler Aminosäurerest (Nu) die elektrophile Transfer-Einheit (E) an. Innerhalb dieser Transferreaktion wird die Reportergruppe kovalent auf das Zielprotein (POI) übertragen. Auf diese Weise kann der Ligand die Bindungsstelle verlassen und das aktive Zentrum freigeben (Abbildung 8).

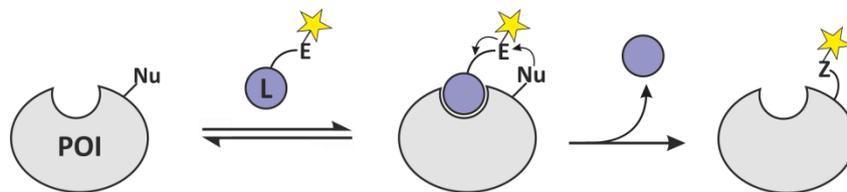


Abbildung 8: Ligand-dirigierte Transferreaktion zur kovalenten Modifikation von Proteinen; E = elektrophile Gruppe, gelber Stern = Reportergruppe, L = Ligand, Nu = nukleophile Aminosäure, POI = Zielprotein und Z = Transferrest.

Eine Möglichkeit zur Übertragung von Reportergruppen ist die Verwendung eines Tosyllinkers (*ligand-directed tosyl chemistry*, LDT, Abbildung 9a).^[138-140] Hierbei dient ein Phenylsulfonsäure-Derivat als elektrophile Gruppe, mittels derer die Markierung in die Nähe einer nukleophilen Aminosäurefunktion gebracht und innerhalb einer klassischen S_N2 -Reaktion auf diese übertragen wird. Mit dieser Methode konnte bereits eine Vielzahl an Zielproteinen unter Verwendung kanonischer Aminosäuren wie His,^[138, 140-146] Tyr, Glu,^[138, 140, 144] Asp^[141, 147] oder Cys^[148] kovalent modifiziert werden. Ein weiteres Beispiel beinhaltet die Verwendung einer Alkyloxazyimidazol-Einheit innerhalb einer Ligand-dirigierten Acylimidazol(LDAI)-Transferreaktion (Abbildung 9b).^[149-150] Dieses Prinzip wurde zur erfolgreichen Markierung diverser Membranproteine, in denen ein Lysinrest adressiert wird, bestätigt.^[149, 151] Neben niedermolekularen Liganden wurde zudem ein Peptidligand verwendet, um eine selektive Markierung des G-Protein-gekoppelten Bradykinin B₂-Rezeptors mittels Acylimidazol-Einheit zu realisieren.^[152]

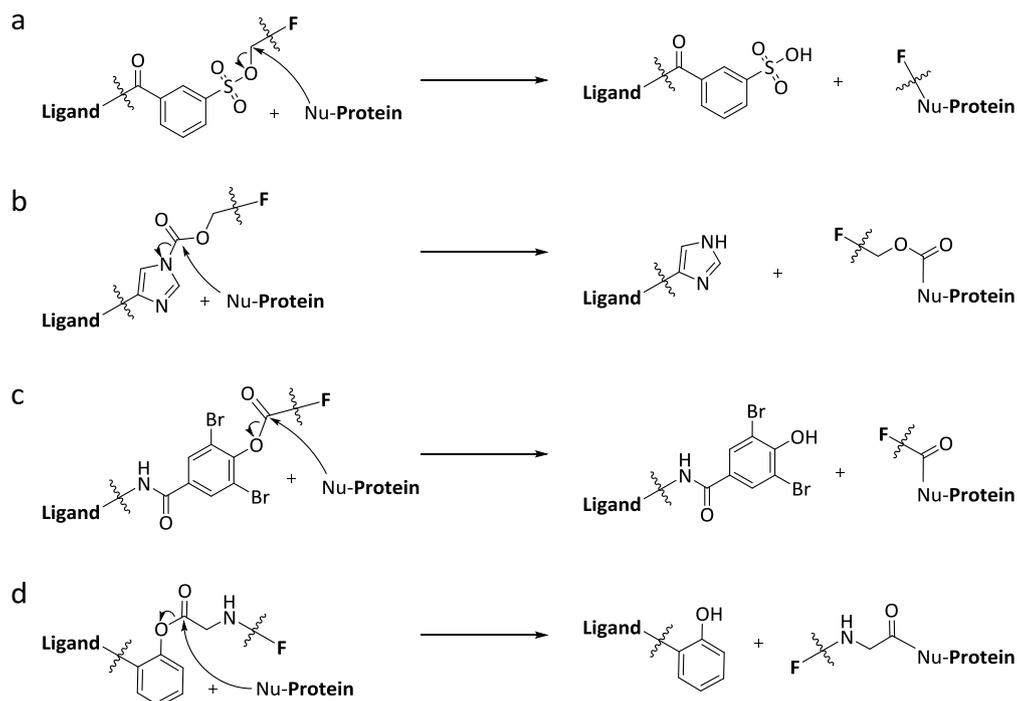


Abbildung 9: Auswahl von Transferendon zur kovalenten Modifikation von Proteinen mittels a) Tosyllinker, b) Acylimidazol, c) ortho-substituierter Phenylester und d) Phenylester; F = Reportergruppe, Nu = nukleophile Aminosäure.

Weitere Beispiele beinhalten einen Phenylester, welcher zur Ligand-dirigierten Transfermarkierung via Lys bzw. His genutzt wurde (LDBB, Abbildung 9c)^[153] oder über eine Acylierungsreaktion die Reportergruppe auf ein in der Nähe befindliches Lysin überträgt (Abbildung 9d).^[154] Ein Ligand-dirigierter zweistufiger Transfermechanismus, der einen 4-Dimethylaminopyridin-modifizierten Liganden und einen Thiophenylester-funktionalisierten Acyldonor beinhaltet, wurde 2008 von Hamachi *et al.* präsentiert.^[155] Zudem sind gerichtete Markierungsreaktionen mittels Thioester an Lys bzw. Tyr^[156-157] sowie eine Peptidligand-dirigierte Markierung eines *N*-terminalen Cysteins auf der Basis eines Acyltransfers bekannt.^[158]

1.3 Peptid-/Protein-vermittelte Reaktionen

Innerhalb Ligand-dirigierter Systeme ist bereits eine Vielzahl chemischer Reaktionen zur selektiven Modifikation von Proteinen untersucht worden. Anders verhält es sich auf dem Gebiet der Peptid- oder Proteintemplat-vermittelten Reaktionen zweier Liganden. Für

dieses Konzept sind wenige Beispiele bekannt. Bei diesem Ansatz wird ein ternärer Komplex ($L_1 \cdot T \cdot L_2$), bestehend aus einem Templat **T** (z. B. Peptid oder Protein) und zwei Liganden (L_1 und L_2), gebildet (Abbildung 10). Enthalten beide Liganden reaktive Funktionen (**E** bzw. **Nu**), die durch die simultane Templatbindung in räumliche Nähe gelangen, können diese, bei korrekter Orientierung ihrer funktionellen Gruppen, zur Reaktion gebracht werden.

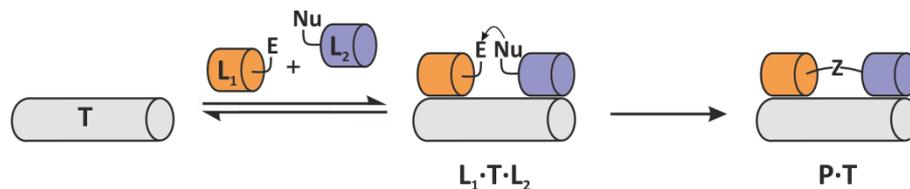


Abbildung 10: Peptidtemplat-vermittelte Verknüpfungsreaktion zweier Peptidliganden L_1 und L_2 ; **E** = elektrophile Gruppe, **Nu** = nukleophile Aminosäure, **T** = Templat und **Z** = Verknüpfungsrest.

Das Konzept der Templat-vermittelten Reaktion zweier Liganden wurde u. a. zum Aufbau dynamisch kombinatorischer Substanzbibliotheken eingesetzt^[159]. Dies ermöglicht die selektive Anreicherung von an Zieltemplat-bindenden Liganden innerhalb ganzer Substanzgemische.^[9] Weitere Beispiele für den Einsatz von Peptid-^[2-4, 44, 160] oder Foldamertemplaten^[10] beinhalten die Selbstreplikation von Peptiden nach dem Prinzip der nativen chemischen Ligation (NCL).^[14-15] Hierbei werden zwei Peptidliganden, die an homologe Bereiche einer peptidischen Matrize binden, mittels C-terminalem Thioester und N-terminalem Cystein unter Bildung einer nativen Amidbindung ligiert. Die so entstehenden exakten Kopien der parentalen Matrize dienen in weiteren Zyklen als Template, wodurch eine autokatalytische Amplifikationskaskade erfolgt.

Trotz der vorhandenen Konzepte zur Peptidtemplat-vermittelten Modifikation wurden bisher sämtliche Ansätze unter artifiziellen Bedingungen getestet. Anwendungen innerhalb einer biologischen Matrix sowie zur Markierung ganzer Proteine sind bisher nicht bekannt. Dabei könnten die besonderen Eigenschaften eines nativ exprimierbaren Proteins, welches als Templat zweier natürlicher Liganden dient, die Untersuchung selektiv vermittelter Reaktionen innerhalb komplexer biologischer Systeme ermöglichen.

1.4 Das KIX-TAD-pKID-Modellsystem

Ein potentielles Modellsystem zur Proteintemplat-vermittelten Reaktion zweier Liganden könnte ein endogen existierender trimerer Komplex aus der Transkriptionsmaschinerie eukaryotischer Zellen darstellen. Dieser besteht aus der Proteindomäne KIX sowie den zwei Ligandenfragmenten pKID und TAD.

1.4.1 Die Proteindomäne KIX

Das Multidomänenprotein CBP (CREB(*cAMP response element-binding*)-bindendes Protein) gehört zur p300-CBP Coaktivatorfamilie^[161-162] und wurde erstmals im Jahr 1993 von Chriava *et al.* beschrieben.^[163] Als Transkriptionscoaktivator^[164] ist es in der Lage, simultane Wechselwirkungen mit der basalen Transkriptionsmaschinerie und diversen Transkriptionsfaktoren auszubilden. Aus diesem Grund spielt CBP eine zentrale Rolle als Interaktionsvermittler und Stabilisator von Transkriptionskomplexen (Abbildung 11).^[165]

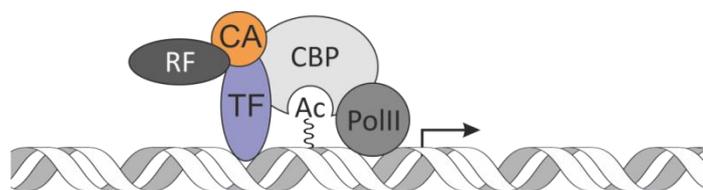


Abbildung 11: Das CREB-bindende Protein (CBP) im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor (TF), dem Coaktivatorprotein (CA), dem Chromatin-Remodellierungsfaktor (RF) und der RNA-Polymerase II (PolII). Die DNA ist als weiß-graue Doppelhelix dargestellt.

CBP wurde bisher ausschließlich in höheren Eukaryoten identifiziert,^[166-167] wobei es dort ubiquitär exprimiert wird.^[168] In seiner Funktion als Histon-Acetyltransferase (HAT)^[169] weist CBP eine hohe Homologie zu seinem Paralog p300 von ca. 72 % auf (humane Varianten).^[165, 168] CBP besitzt einen entscheidenden Einfluss auf eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie die Regulation des Zellzyklus, die Zelldifferenzierung und die Apoptose.^[168, 170] In erster Linie ist es als Auslöser des Rubenstein-Taybi-Syndroms (RTS) bekannt,^[171-172] welches durch Haploinsuffizienz hervorgerufen wird.^[170, 173] Zudem sind direkte Zusammenhänge zu akuter myeloischer Leukämie (AML),^[165] diversen neurodegenerativen Erkrankungen^[168] sowie der Tumorgenese bekannt.^[162, 170, 174]

Die KIX-Domäne ist ein Hauptmediator der von CBP ausgeübten Proteininteraktionen.^[175-176] Der interagierende Bereich besteht aus den Aminosäuren 586 – 671^[177] und ist ca. 10,2 kDa groß. Seine globuläre Struktur besitzt eine Helizität von ca. 62%.^[178] Sie besteht aus drei miteinander interagierenden α -Helizes $\alpha 1$ (As: 597 – 611), $\alpha 2$ (As: 623 – 642) und $\alpha 3$ (As: 646 – 669) sowie zwei kurzen 3_{10} -Helizes G1 (As: 591 – 593) und G2 (As: 617 – 620), die zusammen einen kompakten hydrophoben Kern ergeben (Abbildung 12a).^[179]

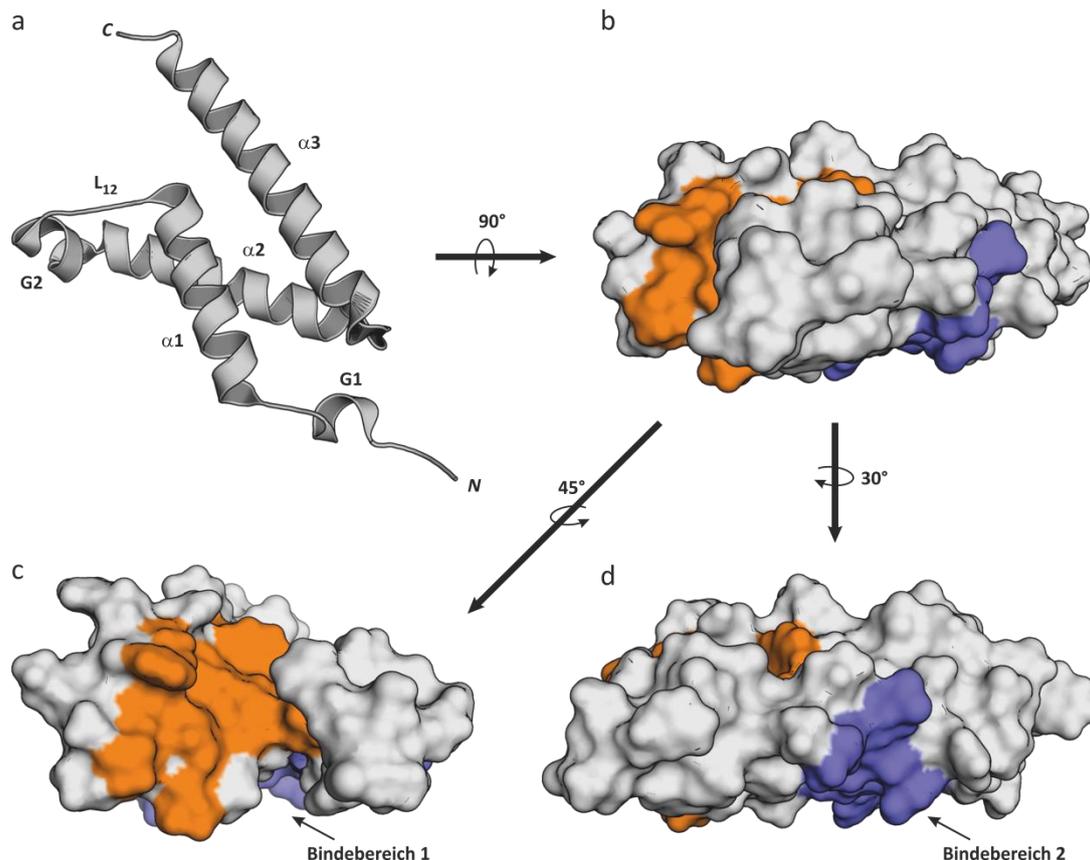


Abbildung 12: Die verwendete KIX-Domäne als a) Helixstruktur und b) um 90° dazu gedrehte Protein-oberfläche. c) Bindebereich 1 (orange) und d) Bindebereich 2 (blau).

Diese Helizes bilden zwei topologisch differente Bindebereiche, die eine Vielzahl diverser Interaktionspartner binden.^[174-175, 177, 180-185] Dabei prägt der C-terminale Bereich von $\alpha 1$ zusammen mit L12, G2 sowie den Helizes $\alpha 2$ und $\alpha 3$ eine tiefe hydrophobe Bindegube aus (Abbildung 12b und c, orange). Im Gegensatz dazu bilden der N-terminale Bereich der Helix $\alpha 1$ und die zentrale Sequenz von $\alpha 3$ eine flache hydrophobe Tasche (Abbildung 12b und d, blau).^[177, 186-187] Die Helizes $\alpha 1$ und $\alpha 3$ liegen dabei nahezu komplanar zu einander vor.^[179] Trotz eines hohen Grads an Sequenzhomologie von KIX innerhalb vorkommender

Organismen konnten unter der Vielzahl an Liganden jedoch keine übereinstimmenden Erkennungsmotive festgestellt werden,^[188-189] wodurch die Art der Ligandendiskriminierung noch nicht eindeutig geklärt ist.^[190]

1.4.2 Die Transaktivator-domäne TAD

Das mixed lineage leukemia (MLL) Protein ist eine Histon-Methyltransferase. Sie agiert als Transkriptionsaktivator (TA) auf epigenetischer Ebene der Chromatinorganisation (Abbildung 11, orange).^[191] Bekannt ist das nukleare Protein hauptsächlich innerhalb der Blutzellenentwicklung als Auslöser der akuten lymphoidischen sowie der akuten myeloidischen Leukämie (ALL bzw. AML).^[192] Dabei handelt es sich um aggressive Arten von Blutkrebs die durch die chromosomale Translokation des *mlL*-Gens an 11q23 entstehen.^[193] Über seine Transaktivator-domäne (TAD, orange) steht MLL in direkter Interaktion zu KIX (grau) (Abbildung 13).^[186, 194]

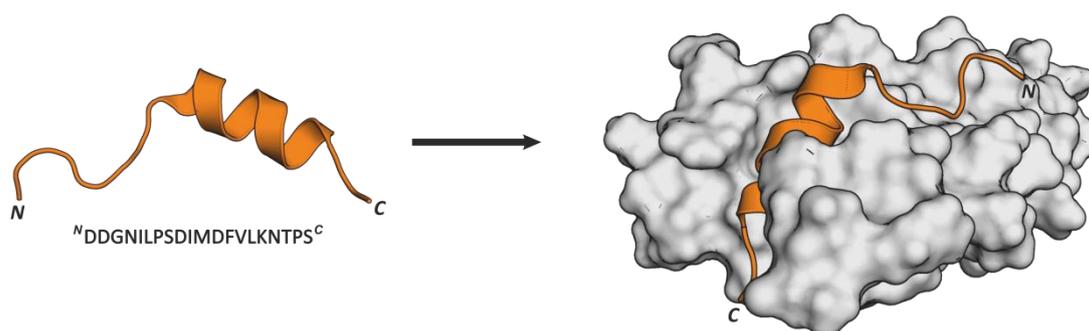


Abbildung 13: Die Transaktivator-domäne TAD von MLL (orange) inklusive der verwendeten Aminosäuresequenz sowie dessen Bindungsweise in den hydrophoben Bindebereich 1 von KIX (grau).

Der für die Bindung verantwortliche Bereich der TAD-Domäne besteht aus 20 Aminosäuren (Positionen 2840 – 2859 in MLL) und hat eine molekulare Masse von ca. 2,29 kDa. Dabei bilden die Aminosäuren 2847 – 2855 C-terminal eine amphipathische α -Helix aus, die in Richtung N-Terminus in einen unstrukturierten Loopbereich übergeht. Innerhalb der unpolaren Bindung an KIX interagiert die Helix mit der tiefen hydrophoben Grube (Bindebereich 1), während der N-terminale Loop exponiert vorliegt, ohne signifikante Interaktionen mit KIX einzugehen.^[177, 186-187, 195] Studien zeigten, dass alle drei Helizes der KIX-Domäne für die Bindung von TAD essentiell sind, sodass bereits die Entfernung einer Helix keine Bindung mehr ermöglicht.^[185]

1.4.3 Die Kinase-induzierbare Domäne pKID

Bei dem *cAMP/Ca²⁺ response element*-bindenden (CREB)^[196-197] Protein handelt es sich um einen 270 kDa großen multifunktionalen Transkriptionsfaktor (TF, Abbildung 11, blau), der als Homodimer an die *cAMP response element* (CRE) DNA-Sequenz bindet.^[198-200] CREB gehört zur bZIP-Superfamilie^[201] und wurde erstmals im Jahr 1987 im Zusammenhang mit der genetischen Regulation von Somatostatin beschrieben.^[202] Studien belegten einen Zusammenhang von überexprimierten CREB-Proteinen und diversen Krebsarten,^[203-207] was dieses Protein zu einem interessanten Forschungsgegenstand innerhalb der medizinischen Forschung macht.^[208]

Innerhalb einer *cAMP*(cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat)-abhängigen Signalkaskade wird CREB mittels Proteinkinase A (PKA) aktiviert.^[209-211] Dies geschieht, indem die PKA das Ser133 der Kinase-induzierbaren Domäne (KID) von CREB selektiv phosphoryliert.^[189, 206, 212] Freies KID liegt als intrinsisch unstrukturiertes Protein (IUP)^[213-215] vor, was bedeutet, dass es aus sich selbst heraus keine definierte Sekundärstruktur einnimmt.^[216-221] Circa 30 % des eukaryotischen Proteoms werden zur Gruppe der IUPs gezählt,^[222] wobei die meisten an der Transkription beteiligt oder in Signalkaskaden involviert sind.^[223] Durch die Phosphorylierung der KID-Domäne (pKID) bindet CREB selektiv an KIX von CBP und rekrutiert es an den Transkriptionskomplex.^[163, 214, 224] Erst durch die Bindung an die KIX-Domäne nimmt pKID seine definierte Sekundärstruktur ein (Abbildung 14).^[225]

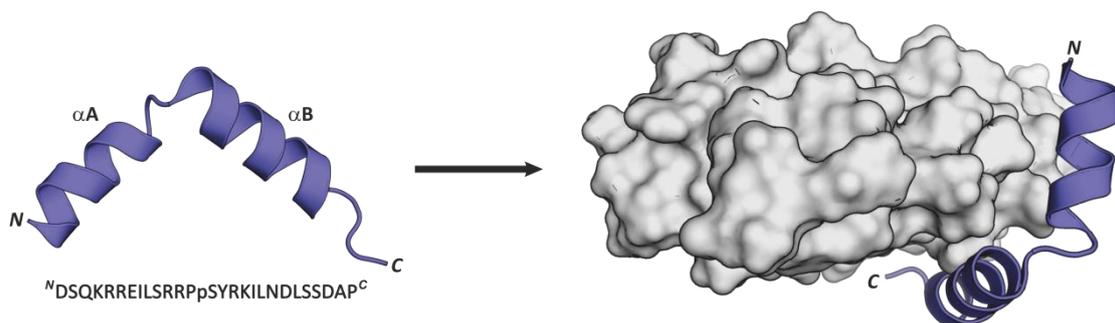


Abbildung 14: Die phosphorylierbare Kinase-induzierbare Domäne (p)KID von CREB (blau) inklusive verwendeter Aminosäuresequenz sowie dessen Bindungsweise an den Bindebereich 2 von KIX (grau).

Der mit KIX interagierende Bereich besteht aus 27 Aminosäuren (Positionen 120 – 146 in CREB) und besitzt eine molekulare Masse von 3,28 kDa. Strukturell besteht das Peptid aus

den zwei α -Helizes αA und αB . Diese sind in einem 90° -Winkel über einen Loop miteinander verbunden und umrahmen die $\alpha 3$ -Helix von KIX.^[179, 225] Die amphipathische wohl definierte αB -Helix, die aus den Aminosäuren 133 – 144 aufgebaut ist, bindet an den flachen hydrophoben Bindebereich 2 von KIX und ist nahezu vom umgebenden Lösungsmittel isoliert. Im Gegensatz dazu bildet die aus den Aminosäuren 120 – 129 bestehende^[179] eher polare αA -Helix lediglich 20 % der Interaktionsfläche aus und liegt exponiert auf der *N*-terminalen Oberfläche von KIX.^[177, 226]

2 Zielsetzung

Bisher existierende Beispiele Templat-gestützter Reaktionen werden vorwiegend von Nukleinsäuren dominiert.^[6-8, 11, 46-47] Nur wenige Modelle Templat-vermittelter Reaktionen sind bekannt, in denen Peptide als Matrizen Verwendung finden.^[2-4, 44, 160] Sämtliche bisher existierende Konzepte sind lediglich artifizieller Art und wurden hauptsächlich zur Verknüpfung zweier Peptidfragmente beschrieben.^[10, 12] Eine attraktive Alternative könnte die Reaktion zweier Peptidliganden unter Verwendung von Proteintemplaten und den damit einhergehenden besonderen Eigenschaften nativer Proteine darstellen. Ein solches Modell ist jedoch bis dato nicht bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Konzipierung eines Systems zur Proteintemplat-vermittelten Reaktion zweier Peptidliganden. Zudem sollte dessen Anwendbarkeit zur selektiven Modifikation von Zielproteinen innerhalb einer biologischen Matrix evaluiert werden.

Zu diesem Zweck wird im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ein geeignetes Modellsystem, bestehend aus einem Proteintemplat (KIX) und zwei Peptidliganden (TAD und pKID), erstellt und hinsichtlich seiner Bindungsaffinitäten mittels Fluoreszenzpolarisation validiert. Anschließend werden beide Peptidliganden derart modifiziert, dass eine nukleophile Verknüpfungsreaktion beider Fragmente ermöglicht wird. Dafür sollen geeignete elektrophile Modifikationen an pKID unternommen und in initialen unvermittelten Reaktionstests auf ihre Reaktivität untersucht werden. Im weiteren Verlauf werden die Anfangsgeschwindigkeiten sowie die Templat-bedingten Reaktionsbeschleunigungen ausgewählter elektrophiler Varianten von pKID in Gegenwart von nukleophil modifiziertem TAD für unterschiedliche pH-Werte evaluiert. Abschließend soll das Potential des Modellsystems zur selektiven Proteintemplat-vermittelten Markierung von Zielproteinen in Zelllysaten untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird, basierend auf den bis dato erlangten Erkenntnissen des trimären Modellsystems TAD·KIX·pKID, die Transferreaktion einer Reportergruppe von einem Donor-(pKID) auf einen Akzeptorliganden (TAD) realisiert. Derart soll ein Reaktionssystem erstellt werden, das aufgrund reduzierter Produktinhibition und somit

eines erhöhten Produkt-Edukt-Austausches, im Vergleich zur Verknüpfungsreaktion, katalytische Umsetzungen erlaubt. Zu diesem Zweck wird die hohe Reaktionsgeschwindigkeit und Chemoselektivität der nativen chemischen Ligation genutzt. Zur Vermeidung potentieller Nebenreaktionen werden die Donorsequenzen optimiert, indem eine Substitution ausgewählter nukleophiler Aminosäuren durch Alanin erfolgt. Die Akzeptorsequenz wird hingegen verkürzt, um in späteren Anwendungen zur Markierung von Zielproteinen eine möglichst minimale Modifikation der Zielproteinsequenz zu gewährleisten. Final soll das Potential des entwickelten Transfersystems zur selektiven Proteintemplat-vermittelten Markierung eines Zielproteins überprüft werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Hinblick auf die gewünschte Verknüpfung zweier Peptide **A** und **B** musste das Proteintemplat **T** das simultane Binden beider Liganden erlauben und diese in eine optimale Orientierung zu einander bringen. Auf diese Weise konnte nach Modifikationen derer N-Termini eine quasi-intermolekulare Reaktion bedingt durch dessen hohe lokale Konzentration ermöglicht werden. Ein System, das diese Prämissen erfüllte, ist ein Heterotrimer bestehend aus der KIX-Domäne (**T**, grau, AS: 587 – 672)^[177] des CREB-bindenden Proteins (CBP),^[166-168, 174, 180-181, 227-229] als Proteintemplat im Komplex mit der Transaktivator-domäne (Peptid **A**, orange, AS: 2480 – 2859) von MLL (*mixed lineage leukemia*) sowie dem Sequenzfragment pKID (Peptid **B**, blau, AS: 116 – 146) aus CREB (*cAMP response element*-bindendes Protein) als Peptidliganden. Für das Design der drei Komponenten (**A**, **T**, **B**) diente die publizierte NMR-Struktur (PDB 2LXT)^[177] des ternären Komplexes als Grundlage (Abbildung 15). Basierend darauf wurden sowohl Proteintemplat-vermittelte Verknüpfungs- also auch Transferreaktionen durchgeführt, um den Effekt Templat-gestützter Reaktionen im Hinblick auf eine mögliche Markierung von Zielproteinen zu untersuchen.

Zur Untersuchung Templat-vermittelter Reaktionen wurden die Vektorkonstrukte **K1 – K7** erstellt. Eine Auflistung dieser Konstrukte und die zugehörigen Vektorkarten sind in den Kapiteln 5.3 und 9.5 dargestellt. Alle Konstrukte wurden vor ihrer Verwendung mittels DNA-Sequenzierung auf Korrektheit überprüft (Kapitel 5.4.7). Eine Übersicht der relevanten Sequenzierungsergebnisse ist in Kapitel 9.6 dargestellt. Eine Übersicht der eingesetzten Primer P01 – P19 ist in Kapitel 9.1 dargestellt. Die aus den Konstrukten **K1 – K7** resultierenden Proteinsequenzen und deren berechneten Parameter sind dem Kapitel 9.4 zu entnehmen. Des Weiteren sind die Aminosäuresequenzen aller synthetisierten Peptidvarianten inklusive der ausgewerteten MS-Analytik in Kapitel 5.8 angegeben. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie(HPLC)-Chromatogramme und die zugehörigen MS-Spektren sämtlicher Peptide und Reportergruppen sind den Kapiteln 9.7 und 9.8 beigelegt.

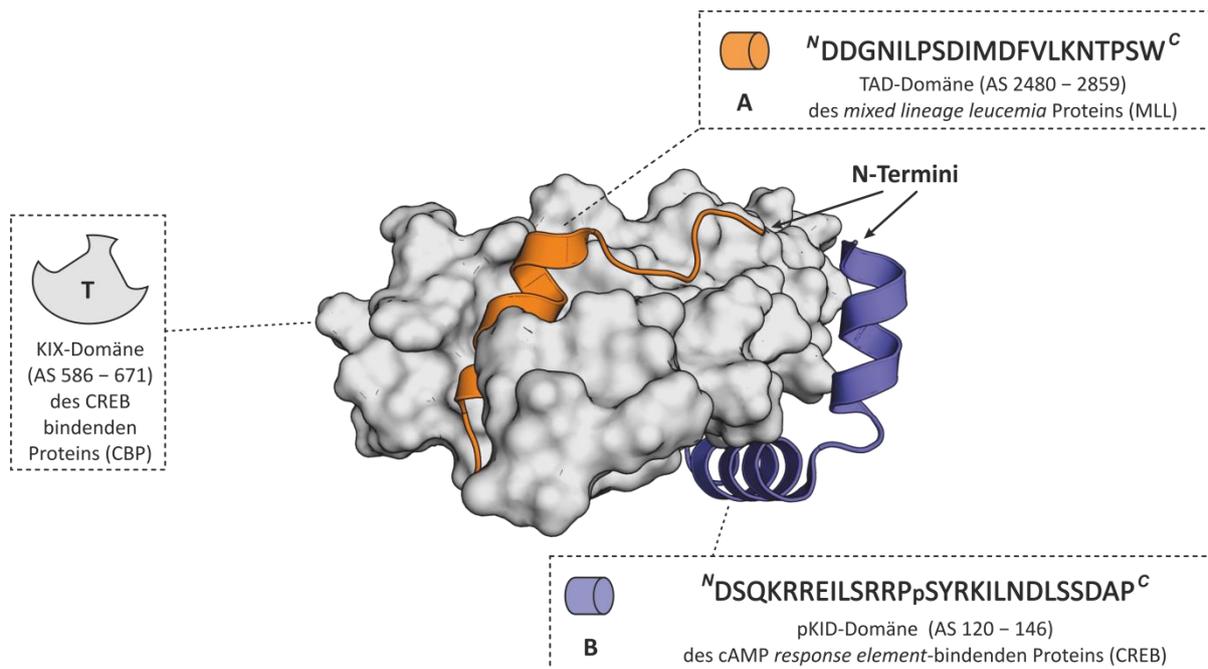


Abbildung 15: NMR-Struktur (PDB 2LXT)^[177] des Proteintemplats **T** (grau) mit den zwei Peptidliganden **A** (orange) und **B** (blau). Gezeigt sind die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzbereiche.

3.1 Versuche zu Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktionen

3.1.1 Design der Templat-vermittelten Verknüpfung

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die Peptidliganden **A** und **B** *N*-terminal derart mit Elektrophilen (**E**) und nukleophilen Funktionen (**Nu**) modifiziert werden, dass mithilfe von **T** eine Verknüpfungsreaktion beider Liganden ermöglicht wurde (Abbildung 16). Zu Beginn erfolgte eine Evaluierung bezüglich einer möglichst schnellen und einfachen Generierung aller Komponenten zwecks initialer Testreaktionen.

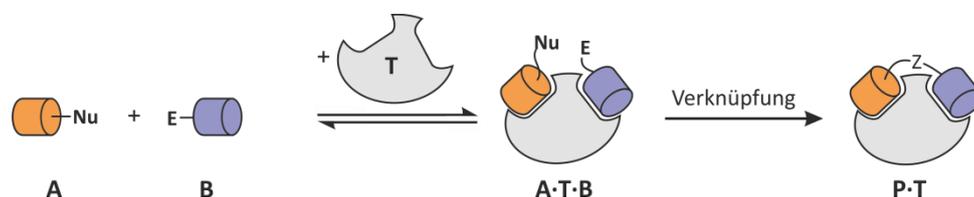


Abbildung 16: Proteintemplat-vermittelte Verknüpfungsreaktion mittels des Modellsystems **A-T-B**. **A** wurde *N*-terminal mit einem nukleophilen Rest (**Nu**) und **B** mit einer elektrophilen Gruppe (**E**) modifiziert; **P** = Verknüpfungsprodukt, **Z** = Verknüpfungsrest.

3.1.2 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung des Proteintemplats T

Da **T** mit einer Größe von 258 Aminosäuren, im Gegensatz zu den Peptiden **A** und **B**, nicht für eine Darstellung mittels Peptidsynthese geeignet war, sollte dessen Herstellung via Expression erfolgen. Aufgrund der Tatsache, dass alle drei Komponenten dieses Modellsystems in der Transkription eukaryotischer Zellen involviert sind,^[166-168, 186] konnte davon ausgegangen werden, dass keinerlei Interferenzen während der heterologen Expression in prokaryotischen Systemen zu erwarten waren. Somit wurde ein Expressionsstamm gewählt, der in der Lage war, gute Proteinausbeuten zu generieren.

Die Wahl des Expressionsstamms

Sowohl die Wahl des Organismus als auch dessen Wachstumseigenschaften sind für die effiziente Expression eines Zielproteins (POI, *protein of interest*) von großer Bedeutung. In der Molekularbiologie hat sich der Gram-negative Prokaryot *Escherichia coli* (*E. coli*) als leistungsstarker Wirt, sowohl für Klonierungsarbeiten als auch für die heterologe Expression rekombinanter Zielproteine, etabliert.^[230] Heutzutage sind diverse *E. coli*-Stämme genetisch erforscht und für zahlreiche Applikationen optimiert worden. Aus diesen Gründen lassen sich diese Zellen leicht handhaben und schnell zu hohen Zelldichten kultivieren. Durch seine hohe Teilungsrate weist *E. coli*, im Vergleich zu Insekten- oder humanen Zellkulturen, die ein deutlich langsames Zellwachstum besitzen, eine geringere Kontaminationsanfälligkeit auf, was seine Handhabung erleichtert.^[230-233] Da in dieser Arbeit ausschließlich Proteine exprimiert wurden, die keiner post-translationalen Modifikation (PTM) bedürfen, wurde der *E. coli*-Stamm BL21Gold(DE3) für sämtliche Expressionsansätze verwendet. Dieser aus *E. coli* entwickelte Stamm wurde für die Expression mittels T7-Promotor optimiert, was ein hohes Expressionslevel gewährleisten sollte. Zudem fehlen diesem Stamm die genetischen Informationen zur Herstellung der Proteasen Lon und OmpT, wodurch der Abbau rekombinanter Proteine vermindert und somit die Gesamtausbeute an Zielprotein gesteigert wird. Für Klonierungsarbeiten wurde der *E. coli*-Stamm One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R eingesetzt. Dieser besitzt eine besonders hohe Transformationseffizienz und wurde zur Verwendung innerhalb von Klonierungsarbeiten optimiert (weitere Details zu den Stämmen siehe Kapitel 5.1.1).

Expression des Proteintemplats T

Das Vektorkonstrukt **K1** (Kapitel 5.3), das für das **T** kodiert, war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Bei dem verwendeten Expressionsvektor handelte es sich um den pET-28a(+)-Vektor, der einen N-terminalen Hexa-Histidin-Tag (His₆-Tag) am Zielprotein generiert. Dieses kann nach erfolgter Expression proteolytisch mittels vorhandener Thrombin-Erkennungssequenz entfernt werden. Zu Beginn wurde **K1** durch DNA-Sequenzierung unter Verwendung der Primer P01 und P02 (Kapitel 9.1) auf Korrektheit überprüft. Die Sequenzierung bestätigte die mithilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*I erfolgreiche Insertion der Zielprotein-kodierenden Gensequenz in den Expressionsvektor. Innerhalb der Auswertung wurde eine Punktmutation des ersten Guanins (g) der *Sal*I-Schnittstelle zu einem Cytosin (c) festgestellt (Abbildung 17, rot). Diese lag jedoch hinter der taa-Terminationsstelle (Stopcodon, grau) des regulären Leserasters, sodass die Sequenz des Zielkonstrukts unverändert blieb. Nach der Überprüfung der korrekten Gensequenz wurden BL21Gold(DE3)-Zellen zur Expression von **T** mit dem Vektor **K1** transformiert.

```

C-Terminus von K1 in Vektor ...aagaaaaaacggaggtcgcggttaagtcgacaagcttg
K1 ...aagaaaaaacggaggtcgcggttaa
P01 ...aagaaaaaacggaggtcgcggttaactcgacaagcttg

```

Abbildung 17: Sequenzierungsergebnis des C-terminalen Bereichs aus dem Zielkonstrukt **K1**; **K1** = Vektorkonstrukt 1, P01 = Sequenzierprimer. Die Punktmutation ist rot, das taa-Stopcodon grau markiert. Die *Sal*I-Schnittstelle (gtcgac) sowie dessen verbliebenes Rudiment (*tcgac*) sind kursiv dargestellt.

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit sich das Zielprotein durch den vorgegebenen Expressionsvektor darstellen und mittels N-terminalen His₆-Tag über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure(Ni-NTA)-Säule aufreinigen ließ. Anschließend wurde ein Aliquot des aufgereinigten Proteins mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) auf Expressionsfähigkeit und Probenreinheit überprüft. Bei erfolgreicher Aufreinigung sollte eine einzelne Bande in der dem Zielprotein entsprechenden Größe von ca. 13 kDa auf dem SDS-Gel sichtbar sein. Die Auswertung ergab neben einer dominanten dem Zielprotein zugewiesenen Bande weitere schlierenartige Markierungen von geringerer molekularer Größe (Abbildung 18a, Bahn 2). Dies könnte für eventuelle Sequenzabbrüche während der Expression oder für eine Degradation des Zielproteins sprechen.

Die Aufreinigungsmethode legte nahe, dass sämtliche auf dem Gel befindlichen Probenmoleküle zugängliche Histidin-Reste enthalten mussten. Um dennoch auszuschließen, dass die zusätzlichen Banden unterhalb der Zielbande dem **T** entsprachen, bei dem endogene Proteasen evtl. bereits den Affinitäts-Tag entfernt hatten, wurde ein Aliquot erneut mittels Ni-NTA-Säule gereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Das SDS-Gel zeigte erneut das Auftreten sämtlicher Banden (Abbildung 18b). Dies war ein Hinweis darauf, dass bei allen eventuell prozessierten Fragmenten der His₆-Tag und somit ein korrekter *N*-Terminus vorhanden sein musste. Zur Unterstützung des Resultats wurde ein Western Blot angefertigt, um eine genauere Untersuchung der verbliebenen Banden mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) durchzuführen (Kapitel 5.3.3 und 5.3.4). Zu diesem Zweck wurde ein primärer Histidin-Antikörper in Kombination mit einem entsprechenden sekundären Antikörper eingesetzt, der an eine Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war. Diese AP konnte so innerhalb einer Farbreaktion zur indirekten Detektion vorhandener Histidinreste eingesetzt werden (Abbildung 18c).

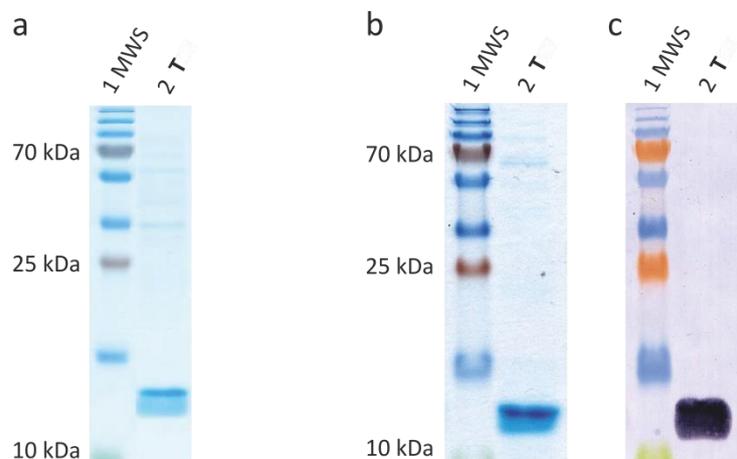


Abbildung 18: a) SDS-PAGE-Gel der initialen Aufreinigung von Proteintemplat **T** mittels Ni-Affinitätschromatographie; Bahn 1 = Molekularer Standardmarker (MWS, *molecular weight standard*), Bahn 2 = Aufgereinigtes **T**, b) SDS-PAGE-Gel und c) Western Blot des aufgereinigten **Ts**.

Das Ergebnis bestätigte die zuvor erhaltenen Erkenntnisse. So waren sämtliche unterhalb des Zielproteins befindlichen Banden mittels Antikörper markiert worden. Des Weiteren waren trotz Aufreinigung diverse schwache Banden im oberen Bereich des SDS-Gels zu erkennen, was auf eine unzulängliche Spezifität des His-Tags für die Aufreinigung dieses Zielproteins deutete. Ein weiteres Argument für den Wechsel zu einem anderen

Expressionsvektor war die schwache Überexpression und die geringe Ausbeute an Zielprotein. Daher sollte der neue Vektor sowohl die Expression optimieren als auch eine Möglichkeit zur Verbesserung der anschließenden Aufreinigung des Proteins bieten.

Die Wahl des Vektorsystems

Neben einem geeigneten Expressionsstamm ist die Wahl des optimalen Vektorsystems ein weiterer Faktor für hohe Expressionsausbeuten löslichen Zielproteins.^[234] Ein optimaler Expressionsvektor sollte diverse Voraussetzungen erfüllen. Beispiele beinhalten die Wahl des Transkriptionsterminators,^[234-237] des Promotors,^[234, 236-239] des Operators,^[240-245] des Replikationsursprungs (*origin of replication, ori*)^[230, 245-246] sowie die Verwendung von Fusionsproteinen.^[234, 247-248] Dabei können diese Faktoren, abhängig von den individuellen Charakteristika des Zielproteins, einzeln oder in Kombination die Ausbeute signifikant steigern.^[232] Aufgrund der hohen Tendenz mancher Fusionsproteine zur schnellen, nativen und stabilen Faltung können diese das sequenziell folgende Zielprotein in einem löslichen Zustand stabilisieren, wodurch sich ihre Möglichkeit zur nativen Faltung erhöht.^[230] Die zur Verfügung stehenden Fusionspartner lassen sich in drei Gruppen unterteilen. In der ersten Gruppe befinden sich Affinitäts-Tags, welche zur späteren Aufreinigung des Zielproteins eingesetzt werden. Hierzu gehören besonders der FLAG-Tag und der Poly-Histidin-Linker (His₆-Tag). Die zweite Gruppe beinhaltet Fusionsproteine, die der Expressions- und Löslichkeitsoptimierung des Zielproteins dienen. Hier sind insbesondere das grün fluoreszierende Protein (GFP) und der NusA(N-utilizing substance A)-Tag zu erwähnen. Die dritte Gruppe besteht aus Fusionsproteinen, welche die Eigenschaften der Gruppen 1 und 2 kombinieren. Zu dieser Gruppe gehören u. a. das Maltose-bindende Protein (MBP), das Thioredoxin (Trx) sowie die Glutathion-S-Transferase (GST).^[234, 238]

Aufgrund der Tatsache, dass für das geplante Proteintemplat **T** sowohl eine Expressionsoptimierung als auch eine anschließende Aufreinigung mit möglichst hoher Reinheit erfolgen sollte, wurde der pGEX-4T-1-Vektor als neues Ausgangskonstrukt zur Klonierung und späteren Expression von **T** verwendet. pGEX-4T-1 kodiert für einen N-terminal am Zielprotein fusionierten GST-Tag, der wahlweise durch eine TEV(tobacco etch virus)- oder eine Thrombin-Protease abgespalten werden kann. Ein weiterer Grund für die

Verwendung des pGEX-Systems war, dass **T** bereits mit dem Vektor pGEX-4T-2, einem nahezu identischen Vektorsystem, erfolgreich exprimiert und aufgereinigt wurde.^[185]

*Optimierte Expression und Charakterisierung des Proteintemplats **T***

Zur Generierung von **K2** wurde **T** mittels Restriktion-Ligations-Protokoll unter Verwendung der Primer P03 und P04 über die Schnittstellen von *NcoI* und *XhoI* in den pGEX-4T-1-Vektor kloniert. Am Ende der Klonierung erfolgte eine Verifizierung des Zielkonstrukts **K2** auf Sequenzkorrektheit mittels DNA-Sequenzierung unter der Verwendung der Primer P05 und P06. Für die anschließende Expression von **T** wurden zunächst BL21-Gold(DE3)-Zellen mit **K2** transformiert (Kapitel 5.5.2). Im Anschluss erfolgte eine Testexpression und Lyse mithilfe eines Ultraschallhomogenisators (Kapitel 5.6.1), um durch eine spätere SDS-PAGE (Kapitel 5.3.2) die Reinheit und Ausbeute von **T** abschätzen zu können.

Die Auswertung zeigte eine sehr starke Expressionsbande von **T** durch die verwendeten Zellen. Zudem verlief der Zellaufschluss hinsichtlich der Proteinlöslichkeit ohne Komplikationen. Vor diesem Hintergrund wurde ein großer Expressionsansatz durchgeführt, wobei nun die anschließende Zellyse durch Hochdruckhomogenisator erfolgte (Kapitel 5.6.2), da diese Methode zum einen gut für große Volumina geeignet ist und zum anderen der Aufschluss erfahrungsgemäß schonender und homogener verläuft als mittels Ultraschall. Das Proteintemplat wurde mithilfe des GST-Fusionsproteins aufgereinigt (Kapitel 5.6.3), gelfiltriert (Kapitel 5.6.4) und anschließend per TEV-Protease vom GST-Tag befreit. Abschließend wurde **T** via Ultrafiltration (Kapitel 5.6.5) aufkonzentriert und durch SDS-PAGE auf Reinheit und Massenbande überprüft. Zur Überprüfung der Probenreinheit wurde eine hohe Probenmenge auf das SDS-Gel geladen, um selbst geringe Verunreinigungsanteile zu visualisieren (Abbildung 19a). Letztlich erfolgte eine molekulare Identifikation von **T** mithilfe von HPLC-Massenspektrometrie(MS) (Abbildung 19b). Eine finale Validierung der korrekten Faltung und der Sekundärstruktur des Proteintemplats **T** via CD-Spektroskopie schloss den Versuch ab (Abbildung 19c).

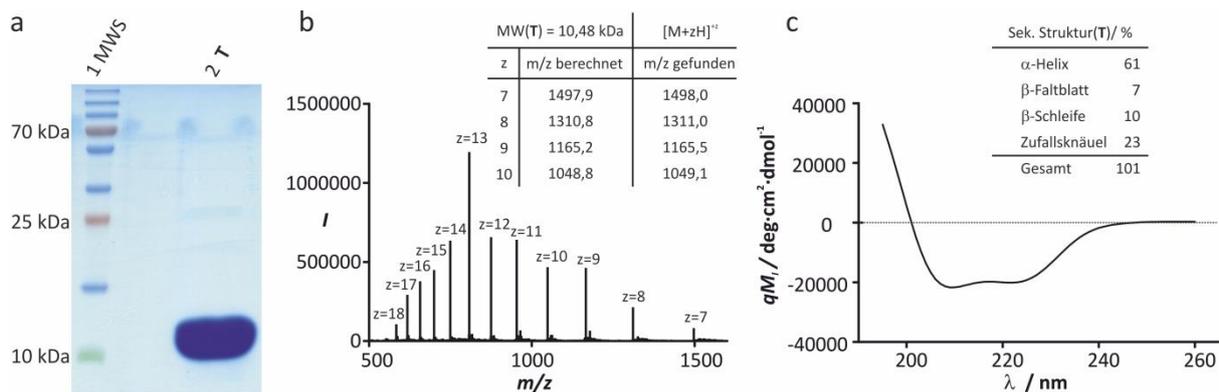


Abbildung 19: Analytik des Proteintemplats **T**. a) SDS-Gel des aufgereinigten **Ts**; Bahn 1 = molekularer Standardmarker (MWS), Bahn 2 = finales **T** nach Aufreinigung, TEV-Verdau und Gelfiltration. b) Masse-zu-Ladungsspektrum (m/z) von **T** mit berechneten und gefundenen Masse-zu-Ladungsverhältnissen; MW = Molekulargewicht (*molecular weight*). c) CD-Spektrum von **T** mit Sekundärstrukturanteilen in %.

Ein Vergleich mit den entsprechenden Banden des Standardmarkers (MWS, *molecular weight standard*) (Abbildung 19a Bahn 1) zeigte, dass Bahn 2 eine Bande im Bereich von etwa 10 kDa aufwies, die der erwarteten molekularen Masse von **T** entsprach (ca. 10,5 kDa). Zudem sprach die Abwesenheit von Verunreinigungsbanden für einen hohen Reinheitsgrad der Probe. Das Massenspektrum (Abbildung 19b) zeigte eine Protein-charakteristische Kuppelform und wies im Vergleich mit berechneten Werten nahezu exakte m/z -Verhältnisse auf (Tabelle). Die Auswertung der CD-Spektroskopie zeigte einen für eine α -helikale Sekundärstruktur typischen Verlauf (Abbildung 19c). Zudem stimmte der berechnete α -helikale Anteil der Sekundärstruktur von 61 % (Tabelle) mit publizierten Werten überein.^[178] In Anbetracht der hier erlangten Erkenntnisse konnte **T** eindeutig identifiziert und hinsichtlich seines nativen Faltungszustands korrekt validiert werden. Somit konnte **T** für das weitere Vorhaben eingesetzt werden.

3.1.3 Synthese Fluoreszenz-markierter Peptide für Fluoreszenzpolarisationsmessungen

Die Templat-vermittelte Reaktion der Peptide **A** und **B** setzt voraus, dass beide Liganden hinreichend hohe Affinitäten zu **T** aufweisen und dieses simultan binden. Um sicherzustellen, dass die modifizierten Peptidsequenzen diese Kriterien erfüllten, wurden die Dissoziationskonstanten bestimmt. Eine geeignete Methode zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von Proteinen und ihren Liganden stellt die Fluoreszenzpolarisierung (FP) dar, die für die Validierung des Modellsystems herangezogen wurde. Zu diesem Zweck wurden **A** und **B**, wie in Kapitel 5.8 beschrieben, zu Beginn durch 9-Fluorenylmethoxy-

carbonyl(Fmoc)-basierte Peptidfestphasensynthese (SPPS) hergestellt und final für die FP-Messung modifiziert (Abbildung 20). Dabei wurden beide Peptidsequenzen *N*-terminal entweder über eine Ethylenglycol-Einheit (PEG1) mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert (**A0*** bzw. **B0***) oder mittels Essigsäureanhydrid (Ac_2O) acetyliert (**A0** bzw. **B0**) (Kapitel 5.8.4), um eventuelle Reaktionen des *N*-terminalen Amins während der Messungen ausschließen zu können. Dabei diene PEG1 als Abstandshalter, um eine Beeinträchtigung der Bindung auszuschließen. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit hergestellten Peptidsequenzen und deren Modifikationen ist in Kapitel 5.8 dargestellt. Nach erfolgter Synthese wurden die Peptide per semi-präparativer HPLC gereinigt (Kapitel 5.3.8). Im Anschluss daran wurden die Isolate via HPLC-MS auf korrekte Identität überprüft und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

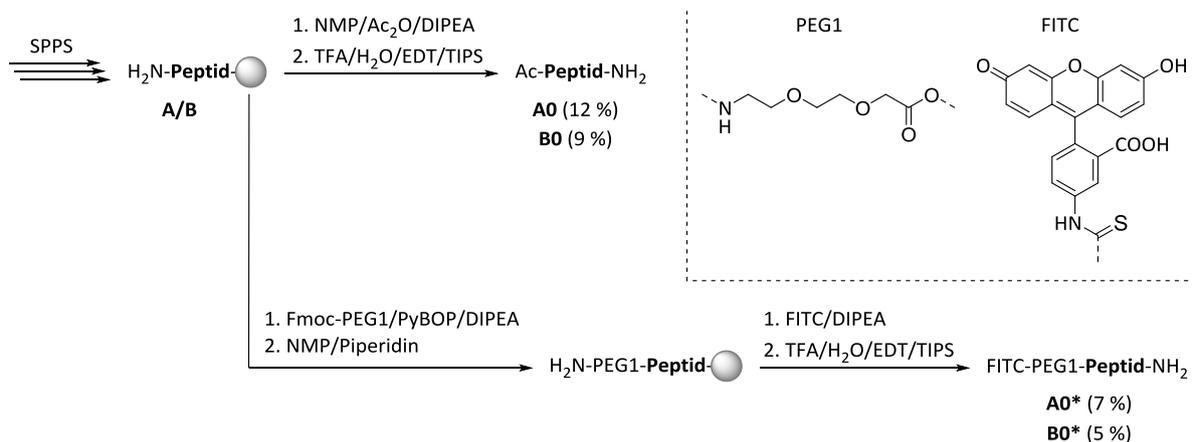


Abbildung 20: Syntheschema der für den FP-Assay modifizierten Peptide **A** und **B**; **A** = DDGNILPSDIMDFVLKNTPSW, **B** = DSQKRREILSRRPpSYRKILNDLSSDAP, * = FITC-modifizierte Peptidsequenz. Die Ausbeuten sind in % angegeben.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten und des Bindungsverhaltens der Peptidliganden **A** und **B** zu **T** wurde eine FP-Messung durchgeführt (Kapitel 5.3.6). Zu diesem Zweck wurden die mit FITC markierten Peptide **A0*** und **B0*** in einer finalen Konzentration von 20 nM und die acetylierten Peptide **A0** und **B0** mit 10 μM in 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure(HEPES)-Puffer eingesetzt. Die Konzentrationen von **T** reichten von 120 μM bis 0,7 nM. Eine erste Messung erfolgte nach 5 min und eine zweite nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Die Ergebnisse der FP-Messung sind in Abbildung 21 dargestellt.

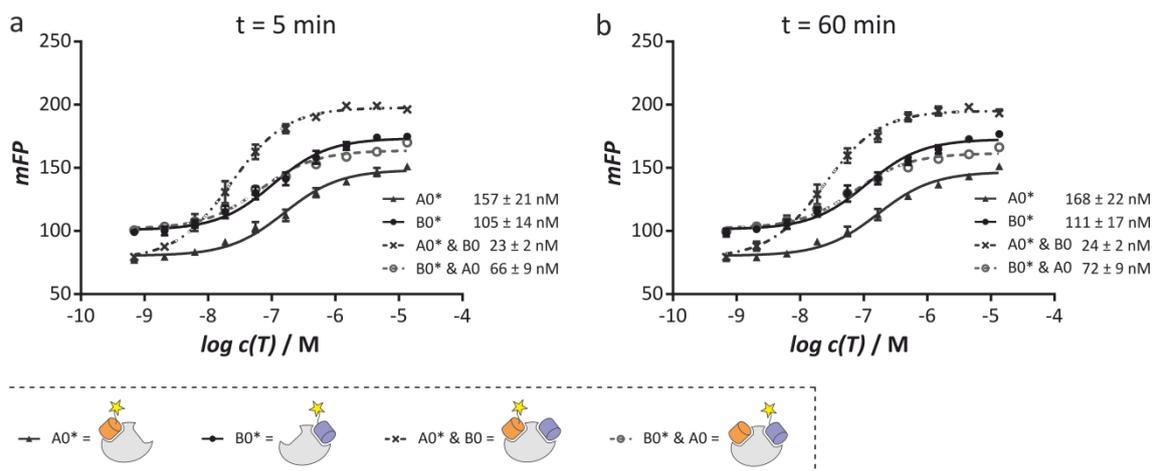


Abbildung 21: Fluoreszenzpolarisationsmessung (FP) zur Validierung des trimeren Modellkomplexes **A0*·T·B0*** nach a) 5 min und b) 60 min; * = FITC-modifizierte Peptidsequenz. Der Fehler bezieht sich auf die Standardabweichung 1 σ .

Die FP-Messung zeigte, dass das System einer sehr schnellen Komplexbildung unterlag, da sich die Werte selbst nach 1 h Inkubation (Abbildung 21b) nicht signifikant von der Messung nach 5 min Inkubationszeit (Abbildung 21a) unterschieden. Zudem konnten für die einzelnen vermessenen Liganden (**A0*** bzw. **B0***) Dissoziationskonstanten (K_d) von etwa 100 – 170 nM bestimmt werden. Im Falle der Messungen, in denen beide Peptide vorlagen (**A0* & B0** bzw. **A0 & B0***), wiesen die Dissoziationskonstanten sogar deutlich niedrigere Werte auf ($K_d \approx 20 - 70$ nM). Für die geplanten Templat-vermittelten Reaktionen wurde der Einsatz mikromolarer Ligand-konzentrationen beabsichtigt. Somit war davon auszugehen, dass die erhaltenen Dissoziationskonstanten eine effiziente Komplexbildung zulassen.^[249] Außerdem zeigten die Daten, dass simultanes Binden beider Peptidliganden nicht nur möglich, sondern sogar kooperativer Natur ist, was mit Ergebnissen anderer Gruppen übereinstimmt.^[184-185] Basierend auf diesen Resultaten konnte das Modellsystem bezüglich der Affinitäten beider Peptide zu **T** für das weitere Vorhaben als geeignet eingestuft werden.

3.1.4 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Aminosäuresequenz B

Die Aminosäuresequenz des Peptids **B** besitzt ein phosphoryliertes Serin an der Position 133 (pSer133). Gäbe es die Möglichkeit, **B** ohne diese Phosphorylierung herzustellen, ohne Affinität zu **T** einzubüßen, könnte das gesamte Modellsystem für spätere zelluläre Anwendungen bereits in prokaryotischen Zellsystemen, wie *E. coli* generiert werden.

Weiterhin sollte ermittelt werden, inwieweit eine eventuelle konstitutive Phosphormimikry des pSer133 durch einen Aspartat- **B**(pS133D) oder Glutamatrest **B**(pS133E) möglich wäre, da diese Substitutionen die essenzielle Wasserstoffbrücke im Gegensatz zur unphosphorylierten Variante **B**(pS133S) eventuell kompensieren könnten. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, inwieweit die Phosphorylierung von pSer133 für das hiesige Vorhaben notwendig war.

Studien zeigten, dass die unphosphorylierte Sequenz **B**(pS133S) nahezu keine Affinität zu **T** aufweist.^[163, 200-201, 209, 213-215, 250] Der Grund liegt in der endogenen Funktion von **B** als interagierende Domäne eines Transkriptionsfaktors, der mittels Phosphorylierung reguliert wird.^[197, 199, 210, 212, 224] Durch diese Phosphorylierung wird die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Phosphatgruppe des pSer133 aus **B** und der Alkoholfunktion von Tyrosin658 aus **T** ermöglicht, was die Haupttriebkraft zur Affinitätserhöhung darstellt (Abbildung 22).

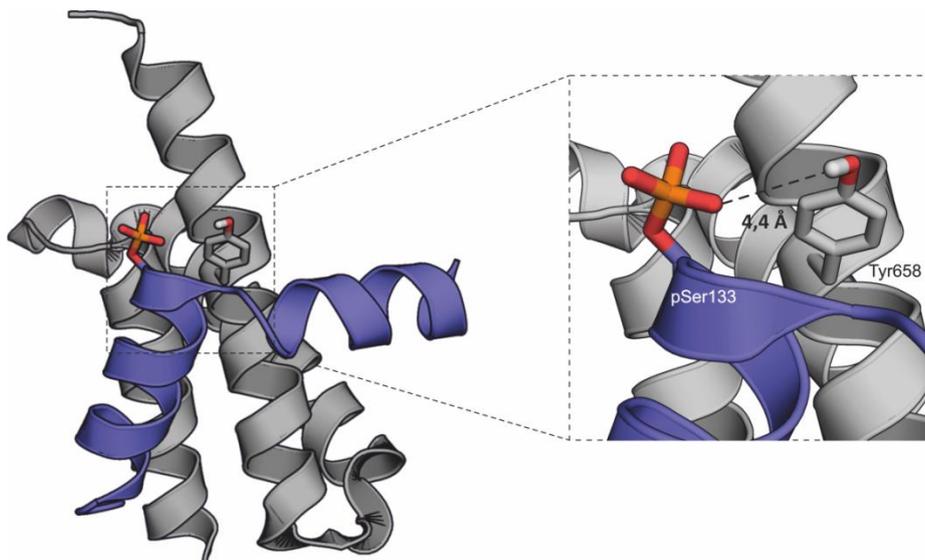


Abbildung 22: Ausschnitt der NMR-Struktur 2LXT^[177] zur Veranschaulichung der an der entscheidenden Wasserstoffbrücke beteiligten Reste von pSer133 aus **B** (blau) und Tyr658 aus **T** (grau).

Durch weitere elektrostatische Interaktionen von pSer133 z. B. mit Lys662^[179, 215] aus **T** wird der **B**•**T**-Komplex zusätzlich stabilisiert. Zudem wird angenommen, dass das phosphorylierte pSer133 die konformelle Freiheit der Loop-Region in **B** einschränkt^[213] und die Peptidgesamtladung des helikalen Makrodipols durch intramolekulare Interaktionen mit

positiv geladenen Seitenketten stabilisiert (u. a. Arg131).^[178-179] Auf diese Weise stabilisiert pSer133 ungebundenes **B** in Lösung und reduziert die entropischen Kosten, die mit der Bindung an **T** verbunden sind.^[213]

Für die Validierung der unphosphorylierten Peptidvarianten wurden zunächst alle drei Peptidsequenzen **BO***(pS133S), **BO***(pS133D) und **BO***(pS133E) mithilfe der automatisierten SPPS hergestellt (Kapitel 5.9) und *N*-terminal über eine PEG1-Einheit mit FITC markiert (Abbildung 23). Letztlich wurden die Peptide mittels semi-präparativer HPLC isoliert und via HPLC-MS charakterisiert. Anschließend wurden alle drei Varianten via FP-Messung mit der bisher getesteten phosphorylierten Sequenz (**BO***) verglichen.

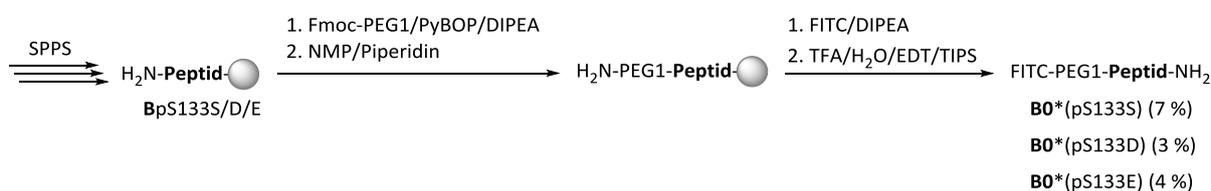


Abbildung 23: Syntheschema der drei unphosphorylierten Peptidvariante **BO***(pS133S), **BO***(pS133D) und **BO***(pS133E); * = FITC-modifizierte Peptidsequenz. Die Ausbeuten sind in % angegeben.

Für die Validierung der Dissoziationskonstanten wurden die verwendeten Peptide in einer finalen Konzentration von 20 nM in HEPES-Puffer eingesetzt. Die Konzentrationen von **T** reichten von 120 µM bis 0,7 nM. Eine erste Messung erfolgte nach 5 min und eine zweite nach 1 h Inkubation bei RT (Abbildung 24). Da bereits bekannt war, dass für die phosphorylierte Wildtypsequenz **BO*** eine sehr schnelle Komplexbildung vorhanden war, die sich über die Zeit nicht signifikant änderte, wurden hier die Messungen nach einer Inkubationszeit von 60 min ausgewertet. Auf diese Weise konnte davon ausgegangen werden, dass die zu testenden Varianten hinreichend Zeit zur eventuellen Bindung an **T** haben.

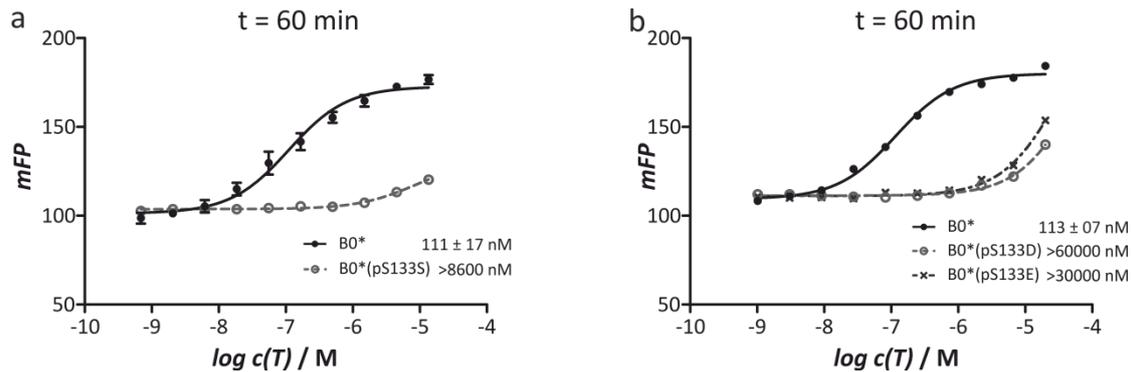


Abbildung 24: a) FP-Messung der unphosphorylierten Sequenz von **B0***(pS133S) im Vergleich zur phosphorylierten **B0*** und b) FP-Messung der mittels Phosphomimikry-modifizierten Varianten **B0***(pS133D) und **B0***(pS133E) im Vergleich zu **B0***; * = FITC-modifizierte Peptidsequenz. Der Fehler bezieht sich auf die Standardabweichung 1σ .

Wie erwartet war die Affinität des unphosphorylierten **B0***(pS133S) deutlich niedriger ($K_d > 8,6 \mu\text{M}$) als die des phosphorylierten Analogons **B0*** ($K_d \approx 111 \text{ nM}$) (Abbildung 24a). Da somit die bisher berichtete Bedeutung der Wasserstoffbrückenbildung bestätigt wurde, war es umso interessanter, ob die Varianten **B0***(pS133D) und **B0***(pS133E) die für die hohe Affinität essenzielle Phosphatgruppe mittels Phosphomimikry kompensieren konnten. Auch hier konnten, mit Dissoziationskonstanten von $> 60 \mu\text{M}$ für **B0***(pS133D) bzw. $> 30 \mu\text{M}$ für **B0***(pS133E), keine hinreichend hohen Affinitäten zu **T** gemessen werden (Abbildung 24b). Diese Ergebnisse wurden durch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt, in denen keine der getesteten Mutationen die Phosphorylierung des Wildtyps kompensieren konnte.^[178, 206, 224, 251-252] Vor diesem Hintergrund wurde innerhalb dieser Arbeit fortan ausschließlich die phosphorylierte **B**-Sequenz verwendet.

3.1.5 Templat-unabhängige Verknüpfungsreaktionen mit Glutathion

Da sämtliche der drei für das Modellsystem benötigten Komponenten **A**, **B** und **T** hergestellt und bezüglich ihres Bindungsverhaltens analysiert wurden, sollten initiale Reaktionstests mit reaktiv modifizierten Peptid-Derivaten von **A** und **B** durchgeführt werden. Im Hinblick auf die Templat-vermittelte Peptidknüpfung beider Peptide wurde **B** zunächst mit diversen elektrophilen Gruppen modifiziert, um diese in einem initialen Reaktionstest in Abwesenheit von **T** mit einem Nukleophil der Wahl reagieren zu lassen. Dies sollte Aufschluss über geeignete Elektrophile für die spätere Templat-vermittelte Verknüpfung geben.

Zu diesem Zweck wurde Peptid **B** mit fünf verschiedenen elektrophilen Gruppen modifiziert (Kapitel 5.8.3). Unter diesen fünf Gruppen befanden sich ein Maleimid- (**B1**), ein Acrylamid- (**B2**), ein Aminoacrylamid- (**B3**) sowie ein Chlor- (**B4**) und ein Fluoracetamid-Derivat (**B5**). Während das Maleimid für seine hohe Reaktivität mit Thiofunktionen bekannt ist^[253], sollte das Fluoracetamid-Derivat als Negativkontrolle eingesetzt werden, da unter den voraussichtlichen Reaktionsbedingungen keine Reaktivität dieser Verbindung mit Thiolen zu erwarten war.^[254] Wie bereits für die FP-Messungen geschehen, wurde auch hier während der SPPS eine PEG1-Einheit zwischen die Peptidsequenz und die jeweilige elektrophile Gruppe eingefügt, um eine hinreichend hohe Flexibilität der elektrophilen Funktion zu gewährleisten. Die Synthese erfolgte nach dem Standardprotokoll der Fmoc-basierten SPPS (Abbildung 25). Anschließend wurden alle Peptide durch semi-präparativer HPLC isoliert, durch HPLC-MS auf ihre Identität überprüft und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

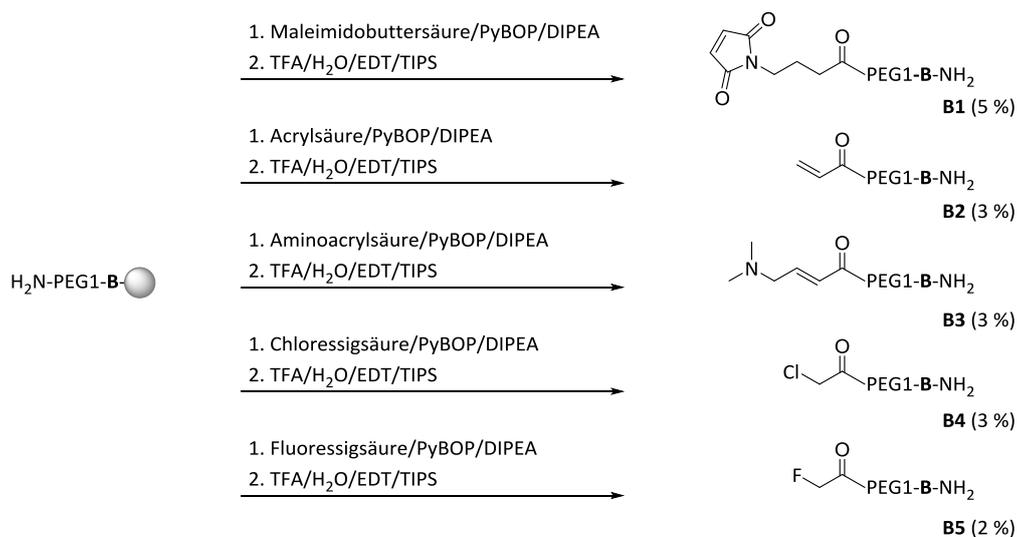


Abbildung 25: Syntheschema zum Aufbau von **B** und der darauffolgenden Modifikationen mit elektrophilen Gruppen zur Generierung der Peptide **B1** – **B5**. Die Ausbeuten sind in % angegeben.

Für eine initiale Einschätzung der Reaktivitäten sollten die Peptide **B1** – **B5** zunächst in Abwesenheit von **T** mit einem geeigneten Nukleophil umgesetzt werden (Abbildung 26). Als nukleophile Testverbindung wurde das Tripeptid Glutathion (**GSH**) ausgewählt, da dessen Cystein als mittlere Aminosäure sehr gut zugänglich ist. Ein weiterer Vorteil ist seine hohe Wasserlöslichkeit.

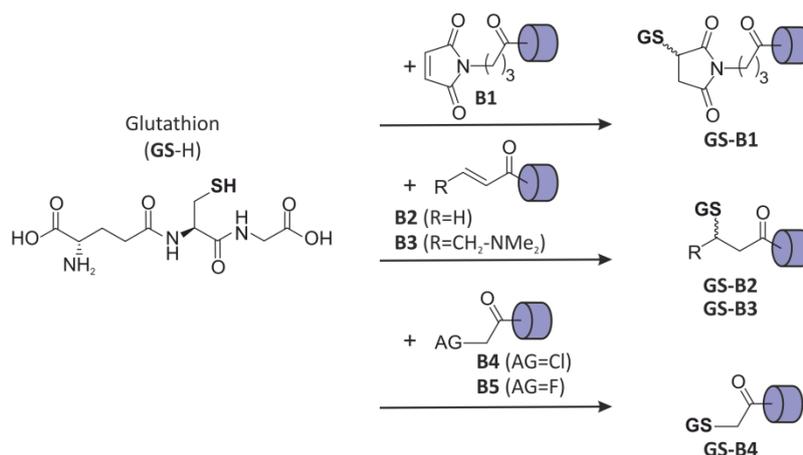


Abbildung 26: Reaktionsschema der initialen Umsetzung von **GSH** mit den Peptiden **B1** – **B5**.

Zur Vermeidung unreaktiver Disulfidbrücken mussten die Thiofunktionen der **GSH**-Moleküle vor jedem Reaktionsstart quantitativ reduziert werden. Thiol-haltige Verbindungen, wie DTT (Dithiothreitol), DTE (Dithioerythritol) und BME (β -Mercaptoethanol) konnten hierbei aufgrund ihrer nukleophilen Eigenschaft nicht eingesetzt werden, da diese selbst mit den elektrophilen Peptiden **B1** – **B5** reagieren können.^[255] Das wasserlösliche Phosphin TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) enthält hingegen keine Thiofunktionen und wird daher oft als mildes Reduktionsmittel eingesetzt.^[256] Vor diesem Hintergrund wurde dem **GSH**-Stock vor jeder Umsetzung mit den elektrophilen Verbindungen eine entsprechende Menge an TCEP frisch zugefügt und für 30 min bei 30 °C vor-inkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die elektrophilen Peptide **B1** – **B5** mit einem Überschuss an **GSH** (10 mM) in gepufferter Lösung und 2 mM TCEP bei 30 °C umgesetzt. Anschließend wurden die Reaktionen mithilfe von Trifluoressigsäure (TFA, 5 % v/v) gestoppt. Zunächst wurden die Proben mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) mit gekoppeltem Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS) auf korrekte Strukturmassen der elektrophilen Peptid-Varianten **B1** – **B5** und der erwarteten Produkte **GS-B1** – **GS-B5** überprüft (Abbildung 27).

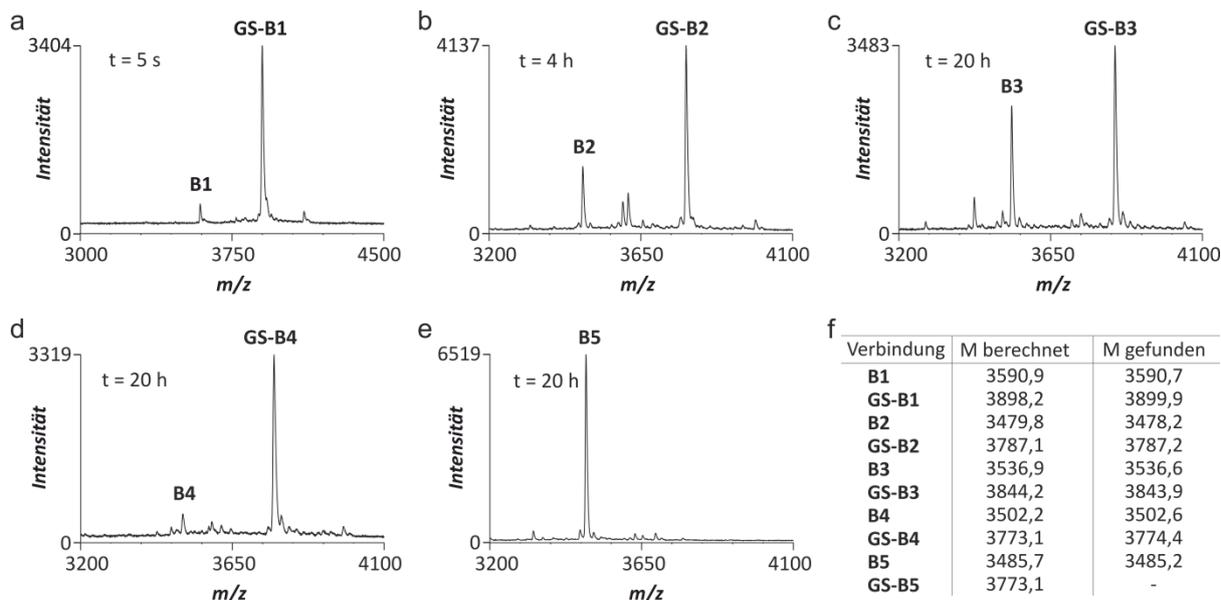


Abbildung 27: MALDI-TOF-Massenspektren der Reaktionen von a) **B1**, b) **B2**, c) **B3**, d) **B4** und e) **B5** mit **GSH** nach individuell repräsentativen Inkubationszeiten. f) Berechnete und mittels MALDI-TOF-MS gefundene molekulare Massen der elektrophilen Edukte sowie der erwarteten Produkte.

Innerhalb der MALDI-TOF-MS-Analyse konnten sämtliche Edukte den korrekten zuvor berechneten Massen zugeordnet werden. Zudem konnte bereits eine Tendenz der Reaktionskinetiken angenommen werden, da in den Proben für **B1** sowie **B4** im Gegensatz zu den restlichen Proben nahezu kein Edukt detektiert werden konnte (Abbildung 27a und d). Im Gegensatz dazu wurde für die Probe **B5** keinerlei Produkt, sondern ausschließlich Edukt nachgewiesen (Abbildung 27e). Da die MALDI-TOF-MS lediglich qualitative Aussagen zur Reaktionsausbeute zulässt, wurde der Fortschritt der Templat-unvermittelten Reaktionen via analytischer HPLC (Kapitel 5.3.8) bei 210 nm bestimmt (Abbildung 28a – e). Dabei wurden die Umsatzraten und Anfangsgeschwindigkeiten mittels Integration der jeweiligen Signalflächen ermittelt (Abbildung 28f). Die Rohdaten der Reaktionskinetik sind dem Kapitel 9.8 beigefügt. Angaben zur Prozessierung der erhaltenen Datenpunkte sind dem Kapitel 5.10.1 zu entnehmen.

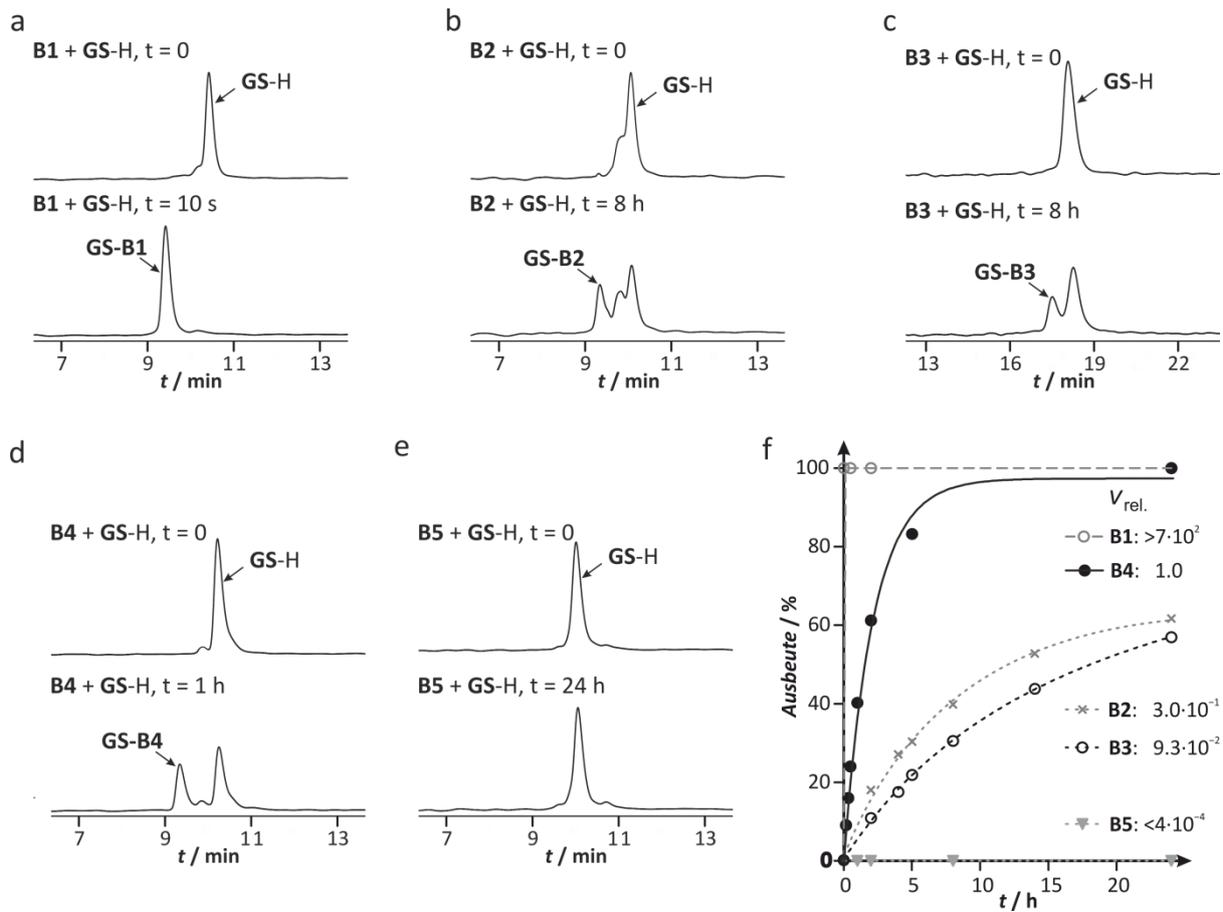


Abbildung 28: Initialer Reaktionstest der fünf elektrophilen B-Varianten **B1** – **B5** mit **GSH**. a) – e) Auswahl repräsentativer HPLC-Spuren der Verknüpfungsreaktion von **B1** – **B5** mit **GSH** zu ausgewählten Zeitpunkten. Innerhalb der analytischen HPLC wurde der Gradient 1 für die Vermessung von **B1**, **B2**, **B4** und **B5** und Gradient 2 für **B3** verwendet. f) Auftragung der via HPLC-Spektren ermittelten Produktausbeuten inklusiver der berechneten Anfangsgeschwindigkeiten ($v_{rel.}$).

Das mit einem Chloracetamid modifizierte Peptid **B4** zeigte die zweithöchste Reaktivität (Abbildung 28d). Um relative Anfangsgeschwindigkeiten ($v_{rel.}$) der getesteten elektrophilen Verbindungen berechnen und in Bezug zu einander setzen zu können, wurde das Peptid **B4** als Referenz eingesetzt. Dementsprechend wurde **B4** eine relative Anfangsgeschwindigkeit von $v_{rel.} = 1$ zugewiesen (Abbildung 28f). Wie erwartet zeigte das Maleimid-Derivat **B1** die höchste Reaktivität (Abbildung 28a). Bereits nach 10 s konnte hier eine quantitative Produktbildung nachgewiesen werden, was eine $v_{rel.} > 7,0 \cdot 10^2$ ergab (Abbildung 28f). Mit relativen Anfangsgeschwindigkeiten von $v_{rel.} = 3,0 \cdot 10^{-1}$ (**B2**) und $v_{rel.} = 9,3 \cdot 10^{-2}$ (**B3**) zeigten die Acrylamid-Derivate eine 6,7- bzw. 11-fach geringere Reaktivität als **B4** (Abbildung 28b bzw. c und f). Sämtliche Resultate stimmen mit den in der MALDI-TOF-MS beobachteten Tendenzen überein. Das mit einem Fluoracetamid-Derivat modifizierte Peptid **B5** zeigte wie

erwartet keinen messbaren Umsatz (Abbildung 28e und f). Aufgrund des Detektionslimits der verwendeten HPLC von 2 nmol Peptidmenge wurde für **B5** eine relative Anfangsgeschwindigkeit von maximal $4 \cdot 10^{-4}$ bestimmt.

3.1.6 Templat-vermittelte Verknüpfungsreaktionen

Synthese eines Cystein-modifizierten **A**-Derivats (**A1**)

Um im weiteren Verlauf dieser Arbeit die geplante Templat-vermittelte Verknüpfung der Peptid-Derivate von **A** und **B** untersuchen zu können, musste im folgenden Schritt eine nukleophile Variante von **A** (**A1**) zum Ersatz von GSH erstellt werden (Abbildung 29). Hierzu wurde **A** zunächst per Peptidsynthese an der festen Phase aufgebaut und *N*-terminal mit einem Cystein als nukleophile Einheit modifiziert (Kapitel 5.8). Final wurde der freie *N*-Terminus innerhalb eines *capping*-Schritts durch Essigsäureanhydrid acetyliert. Dies diente der Unterbindung potentieller Nebenreaktionen des andernfalls freien primären Amins. Nach erfolgter Synthese wurde **A1** mittels semi-präparativer HPLC isoliert und durch HPLC-MS auf korrekte Identität überprüft.

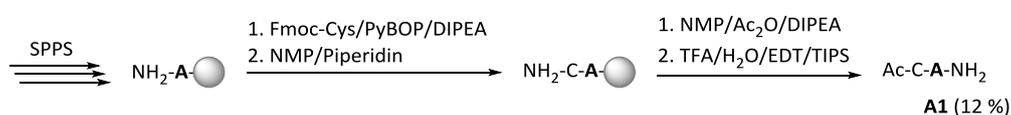


Abbildung 29: Syntheschema des nukleophilen Peptidliganden **A1**. Die Ausbeute ist in % angegeben.

Verknüpfungsreaktionen mit Chloracetamid-modifiziertem Peptid **B4**

Die zu Beginn durchgeführten FP-Messungen wiesen aufgrund der schnellen Bindung von **A** und **B** an **T** bereits darauf hin, dass nicht die Komplexbildung sondern die Verknüpfungsreaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Templat-vermittelten Reaktion sein würde. Aus diesem Grund wurde entschieden, eine schnelle Verknüpfungsreaktion zu verwenden, weshalb lediglich die Peptide **B1** und **B4** zur Auswahl standen. Aufgrund der hohen Reaktivität von Maleimiden mit Thiolen, bereits bei niedrigen Konzentrationen und in Abwesenheit von Templaten,^[253] wurde zunächst das Chloracetamid-Derivat **B4** für die weiteren Untersuchungen verwendet. Da die Templat-unvermittelte Verknüpfungsreaktion des Chloracetamid-Derivats (**B4**) in Gegenwart von

Glutathion bereits gute Reaktionskinetiken aufwies, wurde nun das Reaktionsverhalten von **B4** mit dem nukleophilen Peptid-Derivat **A1** in Anwesenheit von **T** untersucht (Abbildung 30).

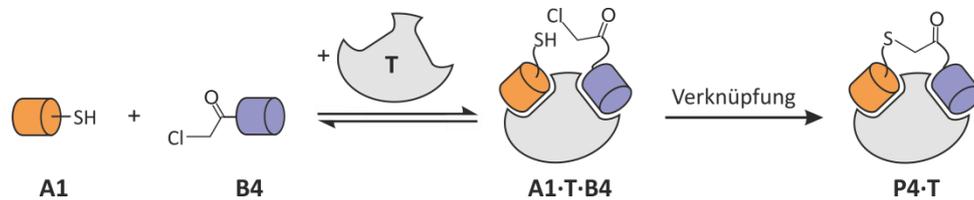


Abbildung 30: Prinzip der Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktion zwischen **A1** und dem Chloracetamid-Derivat **B4** in Gegenwart von **T** zum Produktkomplex **P4-T**.

Zunächst wurde ein initialer Reaktionsansatz zum allgemeinen Nachweis der Systemfunktionalität durchgeführt. Um den Templateffekt dabei zu verdeutlichen, wurden die Messungen sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von **T** durchgeführt. Für die Reaktionsansätze wurde **A1** zunächst für 30 min bei 30 °C in Gegenwart von TCEP vorinkubiert. Für den Reaktionsstart wurden die Komponenten, wie in Kapitel 5.10.1 beschrieben, zusammen gegeben, um eine Reaktionslösung mit je 20 μM **A1**, **B4**, TCEP und ggf. **T** zu erhalten. Die Reaktionen selbst erfolgten bei 30 °C und pH 7,4. Nachdem die Reaktionsansätze mithilfe von TFA gestoppt wurden, konnten die Proben via analytischer HPLC vermessen und ausgewertet werden (Abbildung 31).

In den Kontrollreaktionen in Abwesenheit von **T** konnte keine Produktbildung festgestellt werden (Abbildung 31a, oben). Im Gegensatz dazu wurde bereits nach 3 h eine signifikante Abnahme der Signale von **A1** und **B4** sowie die Entstehung eines neuen Signalpeaks (**P4**) in Gegenwart von Templat **T** beobachtet (Abbildung 31a, unten). Das in Anwesenheit von **T** neu entstandene Signal wurde durch eine analytische HPLC isoliert (Abbildung 31c) und anschließend mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Die daraus erhaltene Molmasse von $M = 5987,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Abbildung 31d) stimmte mit der zuvor berechneten Molmasse ($M = 5987,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Abbildung 31b) des erwarteten Verknüpfungsprodukts **P4** überein, wodurch dieses eindeutig identifiziert werden konnte.

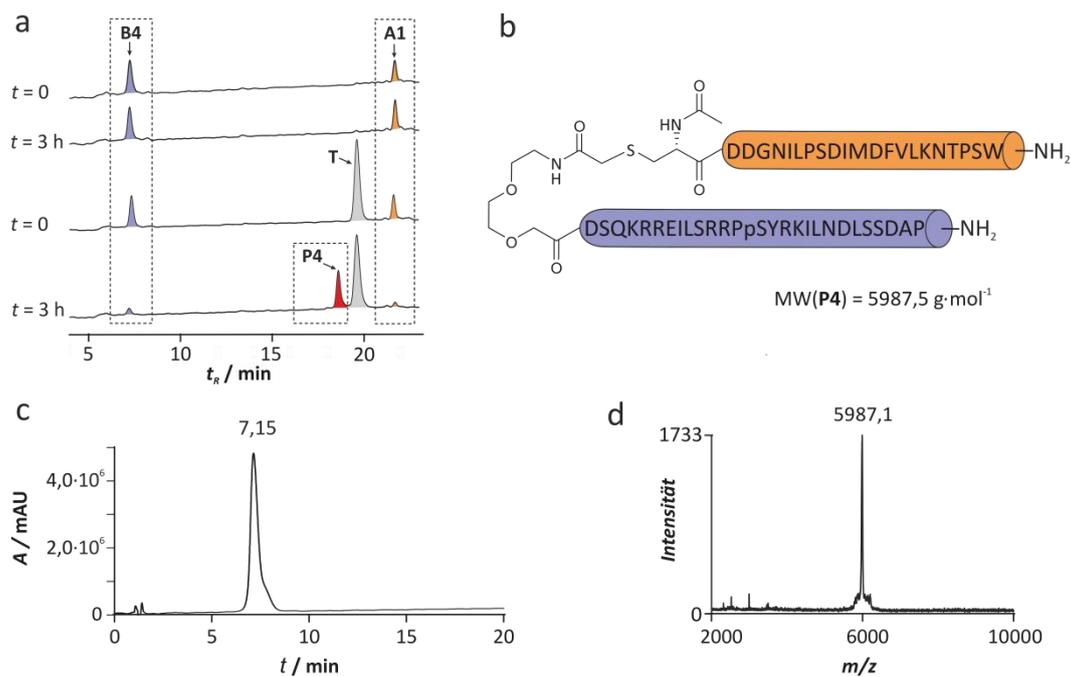


Abbildung 31: a) HPLC-Chromatogramme der Verknüpfungsreaktion von **B4** (blau) und **A1** (orange) in Ab- (oben) und Anwesenheit (unten) von **T** (grau) bei pH 7,4 zum Zeitpunkt $t = 0$ und $t = 3$ h. Innerhalb dieser Messung wurde der Gradient 3 verwendet. Das Produkt **P4** ist rot markiert. b) Struktur des erwarteten Produkts **P4** mit einer berechneten Molmasse von $M = 5987,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. c) HPLC-Chromatogramm des mittels Gradient 4 isolierten Produkts **P4** bei 210 nm. d) MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Verknüpfungsprodukts **P4**.

Nachdem die Funktionalität des Modellsystems und dessen Templateffekt nachgewiesen werden konnten, sollte untersucht werden, inwieweit sich die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen lässt. Dabei war davon auszugehen, dass das Cystein von **A1** mit steigender Basizität an Nukleophilie und somit an Reaktivität zunimmt. Zwecks Untersuchung einer eventuellen pH-Abhängigkeit wurden Templat-vermittelte und -unvermittelte Reaktionen in gepufferter Lösung bei den drei pH-Werten 7,4, 8,4 und 9,4 durchgeführt (Abbildung 32). Die für die Berechnung verwendeten Datenpunkte sind dem Kapitel 9.8 beigelegt. Angaben zur Datenprozessierung sind dem Kapitel 5.10.1 'Prozessierung der kinetischen Daten' zu entnehmen.

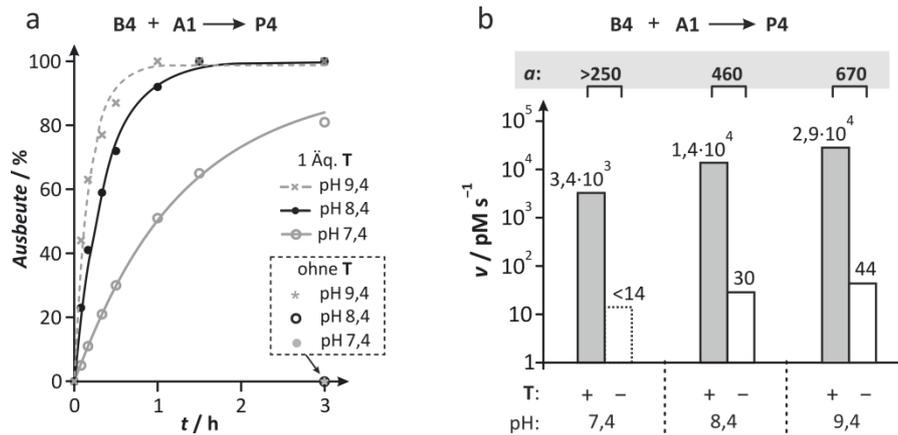


Abbildung 32: a) Reaktionskinetik der Verknüpfungsreaktionen von **B4** und **A1** bei den drei getesteten pH-Werten (7,4, 8,4 und 9,4) in Gegenwart und Abwesenheit von 1 Äquivalent (Äq.) Proteintemplat **T**. b) Logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten v in $\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ aus den pH-abhängigen Reaktionen zwischen **B4** und **A1** mit (grau) und ohne (weiß) **T**. Die Reaktionsbeschleunigung ($\alpha = v(+T)/v(-T)$) ist gegeben.

In Bezug auf die zu testende pH-Abhängigkeit konnte, wie erwartet, eine deutliche Zunahme der Anfangsgeschwindigkeit (v) mit steigendem pH-Wert beobachtet werden (Abbildung 32a). Dies entsprach der Annahme, dass die Nukleophilie des Cysteinrests mit steigender Basizität zunimmt. So war die Anfangsgeschwindigkeit für den pH 9,4 in Gegenwart von **T** mit $v = 30 \cdot 10^3 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$ bereits um das Zweifache höher als für pH 8,4 ($v = 14 \cdot 10^3 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$). Somit konnten mithilfe von **T** die Edukte **B4** und **A1** bei pH 9,4 bereits nach 1 h quantitativ zum Verknüpfungsprodukt **P4** umgesetzt werden. Besonders deutlich konnte der Einfluss des pH-Werts für pH 7,4 veranschaulicht werden. Mit einer Anfangsgeschwindigkeit von $v = 3,4 \cdot 10^3 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$ war die Reaktion um den Faktor 9 langsamer als für den Ansatz bei pH 9,4. Zudem konnte in keinem der untersuchten Templat-unvermittelten Ansätze eine Produktbildung nachgewiesen werden. Um dennoch die Anfangsgeschwindigkeiten der Templat-unvermittelten mit den Templat-vermittelten Reaktionen vergleichen zu können, wurden die Reaktionszeiten von ursprünglich 3 h auf 24 h erweitert. Auf diese Weise konnten zumindest für die Ansätze für pH 8,4 und pH 9,4 Produktausbeuten von 13 % bzw. 19 % in Abwesenheit von **T** nachgewiesen werden. Somit war auch für die Templat-unvermittelten Verknüpfungsreaktionen eine gewisse pH-Abhängigkeit festzustellen, die sich jedoch aufgrund der tendenziell geringen Gesamtausbeuten nicht so ausgeprägt darstellten, wie in Anwesenheit von **T**. Basierend auf diesen Ausbeuten konnten anschließend Anfangsgeschwindigkeiten von $v = 30 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$

(pH 8,4) und $v = 44 \text{ pM}\cdot\text{s}^{-1}$ (pH 9,4) für die Hintergrundreaktionen berechnet werden. Für den pH-Wert 7,4 konnte selbst nach 24 h keinerlei Produktbildung festgestellt werden.

Aufgrund der bereits erwähnten intrinsischen Nachweisgrenze der hierfür verwendeten HPLC von ca. 2 nmol Peptid wurde für pH 7,4 eine theoretische maximale Anfangsgeschwindigkeit von $v = 14 \text{ pM}\cdot\text{s}^{-1}$ angenommen. Eine weitere Größe zur Verdeutlichung des Templateffekts ist die Berechnung der sogenannten Reaktionsbeschleunigungen (a). Diese ergibt sich aus dem Quotienten der Templat-vermittelten und -unvermittelten Reaktionen für den jeweiligen pH-Wert ($a = v(+T)/v(-T)$). Der Vergleich der resultierenden Reaktionsbeschleunigungen aller drei pH-Werte ergab, dass die hier getestete Verknüpfungsreaktion zwischen **B4** und **A1** durch den Einsatz von **T** je nach pH-Wert um das 250 – 670-fache beschleunigt werden konnte (Abbildung 32b). Dies übertraf deutlich die zu Beginn an das System gestellten Erwartungen und veranschaulicht einmal mehr das enorme Potential von Templat-vermittelten Reaktionen.

Verknüpfungsreaktionen mit Maleimid-modifiziertem Peptid B1

Nachdem die Templat-vermittelte Verknüpfung von **A1** mit **B4** erfolgreich nachgewiesen und hinsichtlich seines möglichen Anwendungsbereichs evaluiert wurde, sollte nun eine entsprechende Durchführung für **B1** erfolgen (Abbildung 33).

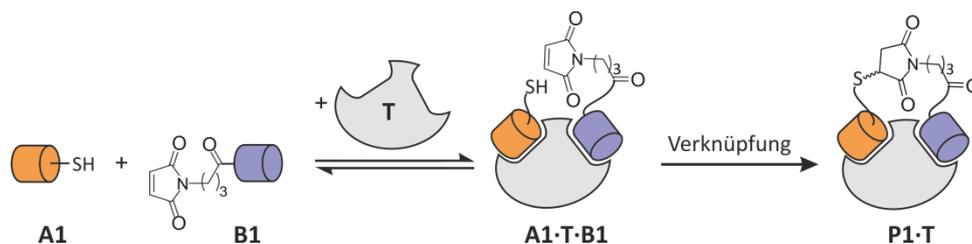


Abbildung 33: Prinzip der Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktion zwischen **A1** und dem Maleimid-Derivat **B1** in Gegenwart von **T** zum Produktkomplex **P1-T**.

Auch hier wurde zu Beginn ein initialer Reaktionsansatz zum allgemeinen Nachweis der Systemfunktionalität durchgeführt. Da sich die Transformation von **B1** mit GSH bei 30 °C sehr schnell vollzog, wurde die Reaktionstemperatur in diesem Ansatz auf 0 °C gesenkt und die Konzentrationen der Edukte auf 5 μM verringert, um die Reaktionsgeschwindigkeiten zu

minimieren und eine bessere Analyse zu ermöglichen. Mit Ausnahme der hier erwähnten Änderungen verlief die Durchführung analog zum initialen Testansatz von **B4**. Nachdem die Reaktionsansätze mithilfe von TFA gestoppt wurden, konnten die Proben via analytischer HPLC vermessen und ausgewertet werden (Abbildung 34).

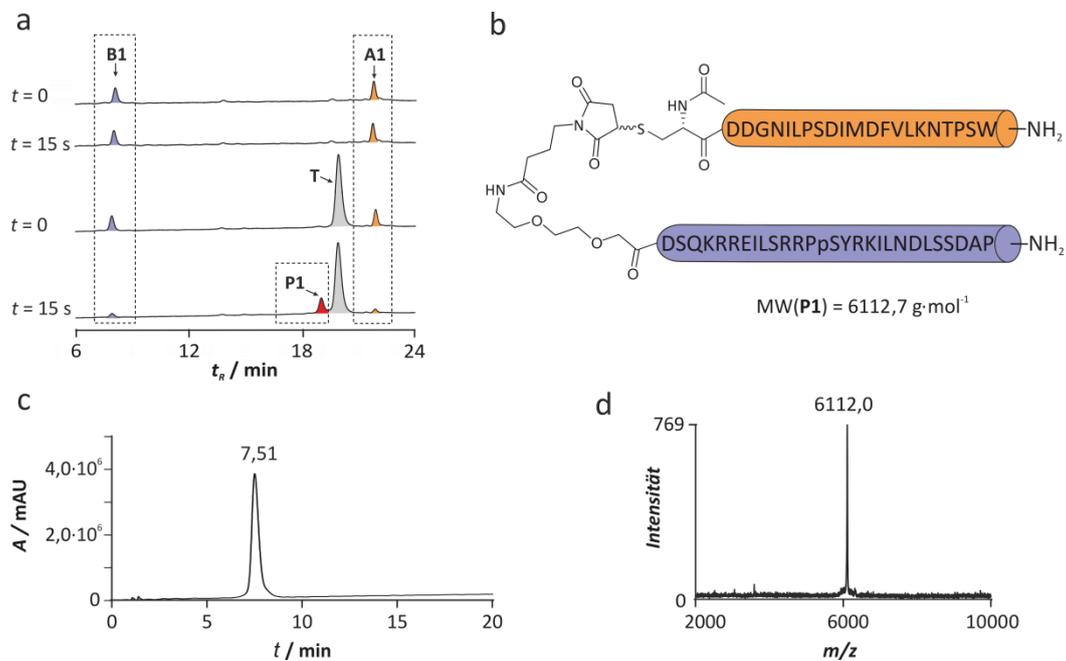


Abbildung 34: a) HPLC-Chromatogramme der Verknüpfungsreaktion von **B1** (blau) und **A1** (orange) in Abwesenheit (oben) und Anwesenheit (unten) von Templat **T** (grau) bei pH 7,4 zum Zeitpunkt $t = 0$ s und $t = 15$ s. Innerhalb dieser Messung wurde der Gradient 3 verwendet. Das Produkt **P1** ist rot markiert. b) Struktur des erwarteten Produkts **P1** mit einer berechneten Molmasse von $M = 6112,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. c) HPLC-Chromatogramm des mittels Gradient 4 isolierten Produkts **P1** bei 210 nm. d) MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Verknüpfungsprodukts **P1**.

In den Kontrollreaktionen in Abwesenheit von **T** wurde keine Produktbildung beobachtet (Abbildung 34 a, oben). Im Gegensatz dazu konnten bereits nach 15 s nahezu keine Signale der Edukte **A1** und **B1** nachgewiesen werden. Stattdessen wurde die Entstehung eines neuen Signalpeaks (**P1**) in Gegenwart von Templat **T** beobachtet (Abbildung 34a, unten). Dieses wurde durch eine analytische HPLC isoliert (Abbildung 34c) und anschließend mittels MALDI-TOF-MS vermessen (Abbildung 34d). Die daraus erhaltene Molmasse von $M = 6112,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ entsprach der zuvor berechneten Molmasse von $M = 6112,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Abbildung 34b), wodurch das entstandene HPLC-Signal dem erwarteten Produkt **P1** zugeordnet werden konnte. Trotz der verringerten Konzentration ($5 \mu\text{M}$) und der Temperatursenkung auf $0 \text{ }^\circ\text{C}$ erwies sich das Maleimid-Derivat **B1** noch immer als äußerst

reaktiv. Da innerhalb der Verknüpfungsreaktion mit **B4** eine pH-abhängige Reaktionsbeschleunigung erzielt werden konnte, wurde das Maleimid-Derivat **B1** auf einen möglichen pH-Einfluss analysiert. Da Maleimide bereits im neutralen pH-Bereich eine hohe Reaktivität mit Thiolen aufweisen, wurden die Reaktionen bei für verschiedene pH-Werte im sauren Bereich in Gegenwart und Abwesenheit von 1 Äquivalent (Äq.) **T** untersucht. Die Reaktionen erfolgten mit Ausnahme der pH-Variation analog zur Testreaktion von **B1**.

Nachdem die Ansätze mittels TFA gestoppt wurden, konnten die Proben per analytischer HPLC ausgewertet werden. Mithilfe der Spektren wurden nachfolgend die resultierenden Anfangsgeschwindigkeiten sowie die Ausbeuten für die Verknüpfungsreaktionen von **A1** mit **B1** zu verschiedenen Zeiten bestimmt. Zur Ermittlung der Reaktionsbeschleunigungen (α) wurden die Anfangsgeschwindigkeiten (v) der Templat-vermittelten und -unvermittelten Reaktionen berechnet (Abbildung 35).

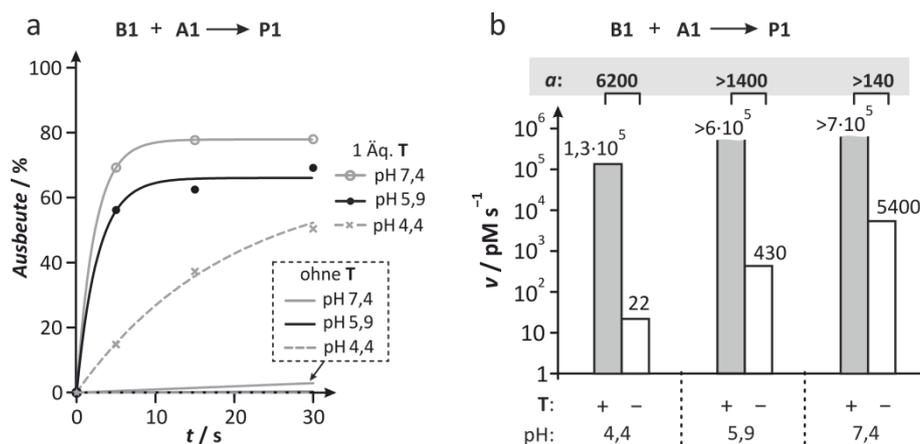


Abbildung 35: a) Reaktionskinetik der Verknüpfungsreaktionen von **B1** und **A1** bei den drei getesteten pH-Werten 7,4, 5,9 und 4,4 in Gegenwart und Abwesenheit von 1 Äq. **T**. b) Logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten v in $\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ aus den pH-abhängigen Reaktionen zwischen **B1** und **A1** mit (grau) und ohne (weiß) **T**. Die Reaktionsbeschleunigung ($\alpha = v(+T)/v(-T)$) ist gegeben.

Im Gegensatz zum Chloracetamid-Derivat **B4** konnten für **B1** in allen drei getesteten pH-Bereichen Anfangsgeschwindigkeiten v für die Reaktionen in Abwesenheit von **T** bestimmt werden. Diese lagen für pH 7,4 bei $5400 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ und für pH 5,9 bei $430 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$, was bereits einer Geschwindigkeitsreduktion um den Faktor 20 entsprach (Abbildung 35b). Mit einer Anfangsgeschwindigkeit von $22 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ für pH 4,4 konnte die Reaktion im Vergleich zu pH 7,4 um das fast 250-fache verlangsamt werden. Basierend auf diesen Werten war bereits zu

diesem Zeitpunkt eine starke pH-Abhängigkeit bezüglich der Reaktivitäten erkennbar. Im Gegensatz zu den moderaten Hintergrundreaktionen in Abwesenheit von **T** wurden die Templat-vermittelten Reaktionen überproportional beschleunigt. Somit konnten für die pH-Werte 7,4 und 5,9 bereits nach 5 s Produktbildungen von mindestens 60 % beobachtet werden. Somit liegen auch die frühen Messpunkte bereits außerhalb des linearen Bereichs, wodurch in diesen Fällen untere Grenzen für die Anfangsgeschwindigkeiten von $v > 6 \cdot 10^5 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$ für pH 5,9 und $v > 7 \cdot 10^5 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$ für pH 7,4 abgeschätzt wurden. Im Falle von pH 4,4 wurde die Templat-vermittelte Reaktion durch die gewählten Reaktionsbedingungen derart verlangsamt, dass hier eine Anfangsgeschwindigkeit von $v = 1,3 \cdot 10^5 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt werden konnte. Unter Verwendung dieser Messdaten ergab sich eine Reaktionsbeschleunigung für pH 7,4 von mindestens 140. Für pH 5,9 konnte die Reaktion sogar um einen Faktor von mindestens 1400 beschleunigt werden. Den größten Templateffekt zeigte jedoch der Vergleich der Templat-vermittelten und -unvermittelten Ansätze für pH 4,4, bei dem eine Reaktionsbeschleunigung von $\alpha = 6200$ berechnet werden konnte (Abbildung 35b). Dieser Wert überstieg sämtliche bis dato berichteten Beschleunigungsraten Templat-vermittelter Reaktionen. Diese lagen in Bereichen von $\alpha = 81 - 1800$.^[10-12] In Anbetracht der ermittelten Werte war, wie bereits auch für das Chloracetamid-Derivat **B4** gezeigt, eine deutliche pH-Abhängigkeit der Reaktionskinetik zu beobachten, was mit den anfänglichen Erwartungen überein sprach. Der enorme pH-Bereich, indem dieses Modellsystem nachweislich erfolgreich eingesetzt wurde, könnte eine Vielzahl möglicher Anwendungen und Einsatzbereiche ermöglichen.

3.1.7 Versuche zur Markierung von Proteinen mittels Verknüpfungsreaktion

Nachdem das Modellsystem **A·T·B** erfolgreich für die Verknüpfung der Peptidliganden **A** und **B** in Lösung eingesetzt und unter genau definierten Bedingungen validiert werden konnte, sollte die Leistungsfähigkeit dieses Systems in Bezug auf seine Geschwindigkeit und Selektivität mittels Markierung von Zielproteinen untersucht werden. Zu diesem Zweck musste zunächst eine für die geplante Reaktion geeignete Fluorescein-markierte Peptidvariante von **B4** erstellt werden (**B4***).

Synthese einer Fluorescein-markierten Variante **B4***

Entsprechend des Verknüpfungsschemas war der *N*-Terminus des Zielpeptids durch das Chloracetamid belegt. Aus diesem Grund wurde das FITC-Molekül C-terminal in das Peptid installiert. Zu diesem Zweck wurde die bisher verwendete Sequenz von **B4** um ein C-terminales Lysin (K) erweitert, welches mittels 4-Monomethoxytrityl-Schutzgruppe (Mmt) innerhalb der SPPS selektiv entschützt und mit FITC modifiziert werden konnte (Abbildung 36). Das synthetisierte und modifizierte Peptid **B4*** wurde vom Harz abgespalten, durch präparative HPLC isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Validierung auf korrekte Identität mittels HPLC-MS.

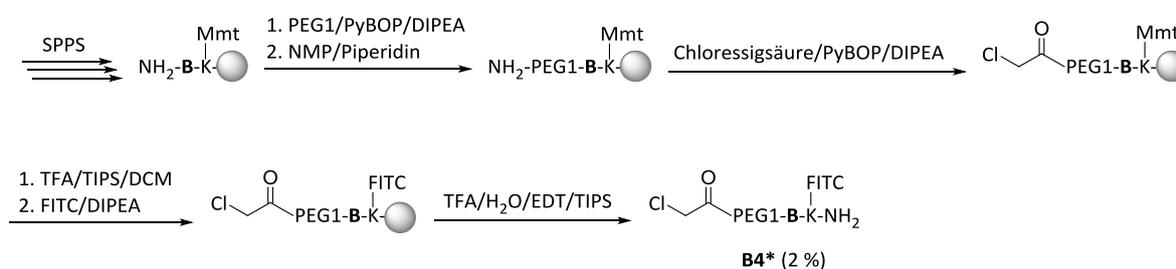


Abbildung 36: Syntheschema der FITC-markierten elektrophilen Peptidvariante **B4***. Die Ausbeute ist in % angegeben; * = FITC-modifizierte Peptidsequenz.

Herstellung von mit **A**-fusionierten **HSP**-Varianten

Nach der erfolgreichen Herstellung von **B4*** musste nun die Wahl eines geeigneten Zielproteins getroffen werden, welches innerhalb der Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktion über eine fusionierte **A**-Sequenz mit **B4*** markiert werden sollte. Aufgrund der Tatsache, dass die Fusion von **A** an das POI eine genetische Modifikation der Wildtypsequenz des POIs darstellte, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht vorhergesagt werden, inwieweit diese Modifikation eine erfolgreiche Herstellung und quantitative Isolierung an löslichen POI beeinträchtigen würde. Da jedoch nicht beabsichtigt war, diverse Optimierungszyklen innerhalb der Klonierung und Expression des Zielkonstrukts durchzuführen, wurde gleich zu Beginn ein Protein verwendet, welches *per se* die Tendenz besaß, sich bereits während der Translation am Ribosom schnell und nativ zu falten.

Eine Proteinklasse, die diese Voraussetzungen erfüllte, war die der Hitzeschockproteine (**HSP**).^[257] Dabei handelt es sich um molekulare Chaperone (Faltungshelfer), die innerhalb von Zellen naszierenden Proteinen selbst unter zellulären Stressbedingungen (Hitze, Kälte, chemischer Stress etc.)^[258-261] bei ihrer korrekten Faltung und funktionellen Reifung unterstützen.^[262] Dieses Charakteristikum ließ Hitzeschockproteine als optimale Kandidaten zur selektiven Markierung mittels Templat-vermittelter Peptidverknüpfung erscheinen. Daher wurde das zur 70 kDa-Familie^[263-264] gehörige Hitzeschockprotein HSPA1A^[265] aus *Homo sapiens* für das weitere Vorhaben eingesetzt (**HSP**).

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit sich diese Markierungsmethode anwenden ließ, wenn die mit einem Cys modifizierte **A**-Sequenz (**cA**) zum einen *N*-terminal und alternativ *C*-terminal an **HSP** fusioniert wurde (**cA-HSP** bzw. **HSP-cA**). Diesbezüglich bestand die Möglichkeit, dass eine *C*-terminale Fusion von **A** an **HSP** eine deutlich geringere bis gar keine Markierung mit FITC zuließ, da das in der Verknüpfungsreaktion involvierte *N*-terminale Cystein von **cA** durch die Sekundärstruktur des Gesamtkonstrukts abgeschirmt und somit unzugänglich sein könnte. Um nachzuweisen, dass eine Markierung der Proteine **cA-HSP** bzw. **HSP-cA** ausschließlich auf das in **A** enthaltene *N*-terminale Cystein zurückzuführen war und nicht etwa auf andere, in **HSP** zugängliche nukleophile Reste, unter denen sich auch ein Cystein befand,^[266-267] sollten zusätzlich von beiden Varianten jeweils nicht-reaktive Mutanten getestet werden. Hierzu wurde das nukleophile Cystein aus **cA** durch ein Alaninrest (*C*→*A*) substituiert (**_AA**), wodurch die Konstrukte **_AA-HSP** und **HSP-_AA** erhalten wurden (Abbildung 37).

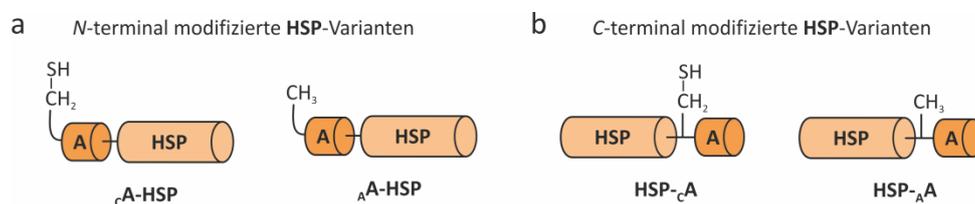


Abbildung 37: Übersicht der vier mit **A** fusionierten **HSP**-Varianten. a) *N*-terminal mit Cys (links) bzw. Ala (rechts) modifizierte Konstrukte **cA-HSP** bzw. **_AA-HSP**. b) *C*-terminal mit Cys (links) bzw. Ala (rechts) modifizierte Konstrukte **HSP-cA** bzw. **HSP-_AA**.

Innerhalb der Klonierung wurde der pET-28a(+) als Expressionsvektor verwendet, der einen *N*- bzw. *C*-terminalen His₆-Tag ermöglicht. Anders als bei dem Konstrukt **K1** wurde nun ein *C*-

terminaler His₆-Tag eingesetzt, da entsprechend der geplanten Verknüpfungsreaktion im Falle der *N*-terminal modifizierten **HSP**-Varianten (**cA-HSP** und **_AA-HSP**) der *N*-Terminus möglichst frei von störenden Sequenzen bleiben sollte.

Zu Beginn wurde ein Zielkonstrukt **K3**, welches für **cA-HSP** kodierte, konstruiert. Basierend darauf erfolgte die Herstellung der verbleibenden drei Konstrukte **K4 – K6**. Zunächst musste die Proteinsequenz von **A** revers in die entsprechende DNA-Sequenz **a** translatiert und aufgrund der Codon Bias (*codon usage*) sequenziell für *E. coli*-Zellen optimiert werden (Kapitel 5.4.2). Dabei wurde die **a**-Sequenz derart designt, dass sie innerhalb des verwendeten gBlocks gB1 beidseitig mit *Nco*I-Erkennungssequenzen flankiert vorlag. Auf diese Weise konnte die Sequenz unter Verwendung von *Nco*I mittels Restriktion-Ligation in den Zielvektor pET-28a(+) kloniert werden. Durch den Einsatz von lediglich einer Restriktionserkennungssequenz konnte statistisch jedes zweite Insert falsch herum im Zielvektor liegen. Eine DNA-Sequenzierung mittels P01 und P02 zeigte jedoch bei diversen Klonen die korrekt orientierte Sequenz von **a**, die 5'-terminal für ein Glycin (ggc, rot) kodierte (Abbildung 38).

```

a in Vektor 5'...gatataccatggggatgacggcaacattctgccgtccgatattatggattttg
a      -----atgggggatgacggcaacattctgccgtccgatattatggattttg
P03 5'...gatataccatggggatgacggcaacattctgccgtccgatattatggattttg

a in Vektor  tgctgaaaaacaccccgtcctgggaaaacctttattttcagggcgccatggcta...3`
a  tgctgaaaaacaccccgtcctgggaaaacctttattttcagggcgccatgg---
P03  tgctgaaaaacaccccgtcctgggaaaacctttattttcagggcgccatggcta...3`

```

Abbildung 38: Sequenzierungsergebnis eines ausgewählten Klons mit korrekt orientierter **a**-Sequenz. Die jeweils erste Zeile (**a** in Vektor) zeigt das gewünschte Zielkonstrukt. Die jeweils zweite Reihe zeigt die Sequenz von **a**. Die jeweils dritte Zeile (P03) entspricht der erhaltenen Sequenz nach DNA-Sequenzierung. Die *Nco*I-Schnittstellen (ccatgg) sind fett, die relevante Glycin-Sequenz (ggc) ist rot markiert. Die *N*-terminale Schnittstelle beinhaltet die atg-Startsequenz (grau) von **a**.

Bei der Klonierung wurde das atg (grau) aus der *N*-terminalen *Nco*I-Erkennungssequenz ccatgg (fett) als Startsequenz für das resultierende Zielkonstrukt verwendet. Da das darauffolgende Basentriplett aus ggc (rot) bestand, konnte das durch die Restriktion verbliebene g als erste Base dieses Tripletts verwendet werden. Andernfalls wäre durch das zusätzliche g eine Leserasterverschiebung erfolgt. Auf diese Weise blieb jedoch der gewünschte Leserahmen erhalten.

Nach der Insertion der **a**-Sequenz in den Zielvektor, musste aus der für ein Glycin kodierenden Sequenz ggc eine Cystein-kodierende Sequenz (tgc) mittels ortsgerichteter Punktmutagenese erstellt werden, um eine für die Verknüpfungsreaktion nukleophile Thiol-Seitenkette zu generieren. Dies erfolgte durch den Austausch des ersten Guanins durch ein Thymin. Des Weiteren konnte auf diese Weise im selben Schritt die 5'-terminale *NcoI*-Schnittstelle entfernt werden, da die weitere Klonierungsarbeit erforderte, dass ausschließlich die 3'-terminale *NcoI*-Erkennungssequenz erhalten blieb. Für die ortsgerichtete Punktmutagenese wurden die Primer P07 und P08 verwendet. Eine nachfolgende Sequenzierung mittels P03 ergab die korrekte Mutante mit einem für ein Cystein-kodierenden Thymin (rot) als erste Nukleobase (Abbildung 39).

a vor Mutagenese	5`...aggagatata ccatgg gcgatg...3`
a nach Mutagenese	5`...aggagatata ccatg gcgatg...3`
P03	5`...aggagatata ccatg gcgatg...3`

Abbildung 39: Sequenzierungsergebnis der ortsgerichteten Punktmutagenese von **a** in pET-28a(+). Reihe 1 = Ausgangssequenz mit dem für ein Glycin kodierenden Basentriplett ggc. Die *NcoI*-Schnittstelle ist fett markiert. Reihe 2 = Die gewünschte Sequenz mit dem durch Punktmutagenese erhaltenen Basentriplett tgc. Reihe 3 = Die DNA-Sequenz nach Punktmutagenese. Die Position des jeweils relevanten Nukleotids (g für Gly bzw. t für Cys) ist rot, die atg-Startsequenz von **a** grau markiert.

Anschließend wurde das **hsp**-Gen an das 3'-Ende von **a** kloniert. Hierfür musste **hsp** zunächst aus einem pCMV6-XL5[*hsp70*]-Vektor der Firma OriGene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter der Verwendung von P09 und P10 heraus amplifiziert werden. Durch die verwendeten Primer wurden die Restriktionsendonuklease-erkennungssequenzen für *NcoI* und *XhoI* flankierend an das Amplikon angefügt. Über diese konnte das Amplifikat im Anschluss via *in vivo cloning* (IVC) in den Zielvektor eingefügt werden. Um die Korrektheit des erhaltenen Klons zu bestätigen, wurde eine DNA-Sequenzierung mittels P01, P02 und P11 – P13 durchgeführt (Abbildung 40).



Abbildung 40: Nachweis der zwei stillen Mutationen innerhalb der **hsp**-Sequenz. a) Sequenzausschnitt des **hsp**-Wildtyps (obere Sequenz) im Vergleich zur erhaltenen mutierten Sequenz (untere Sequenz) aus der DNA-Analyse. b) **hsp**-Sequenz und die resultierende **HSP**-Proteinsequenz des Wildtyps. c) **hsp**-Sequenz und die resultierende **HSP**-Sequenz der erhaltenen Doppelmutanten. Die betroffenen Basenpositionen sind rot markiert.

Bei **hsp** zeigten sich zwei Punktmutationen (rot) innerhalb der Basensequenz. Beide Änderungen befanden sich jedoch an der, innerhalb des für die jeweilige Aminosäure kodierenden Basentriplets,^[268] dritten Position (*wobble position*). Aufgrund der Redundanz des genetischen Codes traten lediglich stille Mutationen auf, wodurch sich keine Veränderungen in der resultierenden Aminosäuresequenz ergaben (vgl. Abbildung 40b und c).^[269] Das Konstrukt **K3** konnte somit erfolgreich kloniert werden. Im weiteren Verlauf wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese die für die Variante **_AA-HSP** kodierende DNA-Sequenz **K4** erstellt. Dafür wurde das für ein Cystein kodierende Basentriplett (tgc) in eine für ein Alanin (Ala) kodierende Sequenz (gcc) unter der Verwendung von P14 und P15 mutiert. Die Korrektheit der Sequenz wurde durch Sequenzierung mittels P01 und P02 verifiziert. Nach erfolgreicher Klonierung der zwei *N*-terminal modifizierten **HSP**-Konstrukte **K3** und **K4**, die für **_CA-HSP** bzw. **_AA-HSP** kodierten, sollten nun auch reaktive und unreaktive Varianten (**K5** bzw. **K6**) erstellt werden, in denen die resultierenden **A**-Sequenzen *C*-terminal vom **HSP** lagen (**HSP-_CA** und **HSP-_AA**).

Zu diesem Zweck wurde **hsp** innerhalb einer Amplifikations-PCR mittels P09 und P10 erneut aus dem pCMV6-XL5[*hsp70*]-Vektor isoliert. Anschließend wurde das Amplifikat via *Nco*I und *Xho*I über IVC in den leeren Zielvektor pET-28a(+) kloniert. Nach erfolgreicher Insertion von **hsp** wurde eine **α** -Sequenz, die im Zielprotein *N*-terminal für ein Cystein (**K5**) bzw. Alanin (**K6**) kodiert, an den 3'-Terminus der **hsp**-Sequenz gefügt. Dafür wurde der gBlock gB2 (für **K5**) bzw. gB3 (für **K6**) mittels IVC in den mit *Xho*I geschnittenen Zielvektor inseriert. Obwohl

erneut lediglich ein Restriktionsenzym eingesetzt wurde, lag hier die Wahrscheinlichkeit, dass das Zielgen falschherum im Vektor lag, nicht wie zuvor bei 50 %. Dies ist dem Prinzip des IVCs geschuldet, indem das jeweilige Insert bereits von Vektor-spezifischen Sequenzen flankiert vorliegt. Auf diese Weise wurde die Insertionsrichtung des Amplifikats trotz identischer Schnittstellen im Zielvektor eindeutig vorgegeben und somit eine falsche Orientierung ausgeschlossen. Die daraus resultierenden Konstrukte **K5** und **K6** wurden mittels Sequenzierung unter der Verwendung von P01 und P02 als korrekt verifiziert. Nach erfolgreicher Herstellung der benötigten Konstrukte **K3** – **K6** wurden nun die vier Zielproteinvarianten **cA-HSP**, **_AA-HSP**, **HSP-cA** und **HSP-_AA** mittels BL21-Gold(DE3)-Zellen exprimiert. Anschließend wurden die Zielproteine über eine Ni-NTA-Säule, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie, aufgereinigt. Final wurden die isolierten Zielproteine mittels Ultrafiltration auf eine Konzentration von ca. 2 mM aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE bezüglich ihrer Reinheit und korrekten Molekulargewichte analysiert (Abbildung 41, Bahn 2 bis Bahn 5).

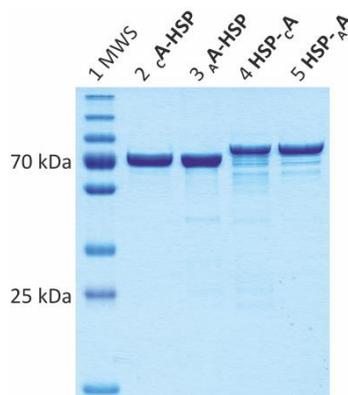


Abbildung 41: SDS-PAGE-Gel der vier mit **A** fusionierten **HSP**-Varianten nach Aufreinigung; Bahn 1 = MWS, Bahn 2 = **cA-HSP**, Bahn 3 = **_AA-HSP**, Bahn 4 = **HSP-cA** und Bahn 5 = **HSP-_AA**. **cA** deutet auf ein *N*-terminales Cys innerhalb der **A**-Sequenz hin. **_AA** deutet auf ein *N*-terminales Ala innerhalb der **A**-Sequenz hin.

Alle vier Zielproteine konnten in hinreichend hoher Reinheit erhalten werden. Erwähnenswert ist, dass die *C*-terminal mit **A** fusionierten **HSP**-Varianten **HSP-cA** und **HSP-_AA** (Abbildung 41, Bahn 4 und 5) deutlich stärkere Verunreinigungsbanden in den finalen Fraktionen aufwiesen, als die *N*-Terminal fusionierten Varianten (Abbildung 41, Bahn 1 und 2). Da die zusätzlichen Banden in den geplanten Markierungsreaktionen jedoch nicht markiert werden sollten, würde dies die Selektivität der Templat-vermittelten

Verknüpfungsreaktion unterstreichen. Daher wurden keine weiteren Maßnahmen zur Entfernung der verbliebenen Banden getroffen.

Markierungsreaktionen der N-terminal modifizierten **HSP**-Varianten

Zu Beginn wurden die N-terminal modifizierten Varianten ϵ **A-HSP** und α **A-HSP** innerhalb einer Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktion mit **B4*** getestet (Abbildung 42a). Für die Markierung der aufgereinigten Zielproteine wurden die **HSP**-Varianten (40 μ M) für 30 min in Natriumphosphatpuffer vor-inkubiert. Anschließend wurden sie in einem Verhältnis von eins zu eins mit einer gepufferten Lösung FITC-markiertem Peptids **B4*** (40 μ M) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 1 Äq. Proteintemplat (\pm **T**) vermischt. Für die Reaktionsansätze mit Zelllysat wurden 35 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Gesamtprotein mit gleichem Volumen FITC-markierten Peptids **B4*** (40 μ M) und ggf. mit 1 Äq. Proteintemplat (\pm **T**) vereint und bei 30 °C inkubiert (Kapitel 5.10.1). Zur Visualisierung der Markierung von ϵ **A-HSP** wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Das resultierende SDS-Gel wurde via Fluoreszenzlesegerät ausgelesen und anschließend mittels Coomassie-Färbung gefärbt (Abbildung 42b).

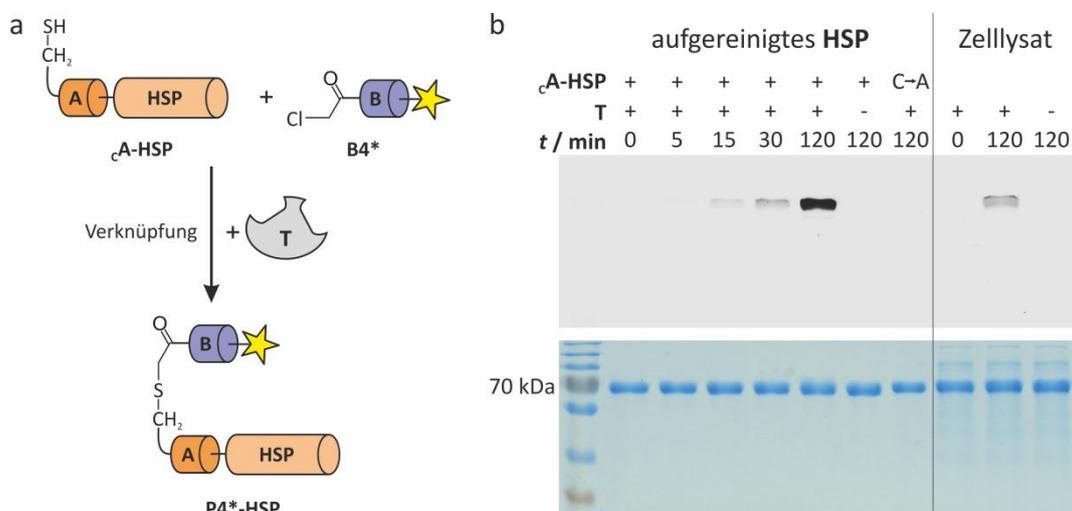


Abbildung 42: a) Prinzip der Verknüpfungs-reaktion zur N-terminalen Markierung von ϵ **A-HSP**. b) Fluoreszenzbild (oben) und Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (unten) der Markierungsreaktion der zwei N-terminal modifizierten ϵ **A-HSP**- bzw. α **A-HSP**-Varianten vom aufgereinigten **HSP** (links) und Zelllysat (rechts).

In Anwesenheit von **T** wurde eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität innerhalb der getesteten Reaktionszeit beobachtet (Abbildung 42b, oben, linke Spalte). Dies spricht für eine mit der Zeit voranschreitende Templat-vermittelte Verknüpfung von ϵ **A-HSP** mit

B4* zum fluoreszenzmarkierten Produkt **P4*-HSP** (Abbildung 42a). Selbst nach der maximal getesteten Reaktionsdauer von 120 min konnte für den Reaktionsansatz in Abwesenheit von **T** keinerlei Fluoreszenz der zugehörigen Probenbande detektiert werden. Der Vergleich von **cA-HSP** mit der korrespondierenden Alanin-Mutanten **_ΔA-HSP** zeigte auch nach 120 min kein Fluoreszenzsignal für **_ΔA-HSP**, was belegt, dass nur das entsprechende Cystein der eingeführten Peptidsequenz modifiziert wird. Somit konnten falsch positive Signale, die u. a. durch die Reaktion von **B4*** mit anderen in **HSP** exponierten nukleophilen Aminosäuren denkbar waren, ausgeschlossen werden. Dieses Resultat bestätigt die postulierte Selektivität des Modellsystems. Weiterhin konnte die Anwendbarkeit des Systems in ganzem Zelllysate nachgewiesen werden. So war nach 120 min eine fluoreszierende Bande in Gegenwart von **T** zu beobachten (Abbildung 42b, rechts). Auch hier konnte kein Signal in Abwesenheit von **T** detektiert werden. Das zugehörige mit Coomassie gefärbte SDS-Gel (Abbildung 42b, unten) zeigt zum einen den Reinheitsgrad der isolierten Zielproteine (links) und zum anderen das Vorhandensein weiterer Proteine im verwendeten Zelllysate (rechts). Weiterhin konnte auf diese Art gezeigt werden, dass jede Bahn die gleiche Menge an Gesamtprotein enthielt, was für einen realistischen Vergleich der detektierten Fluoreszenzsignale eine notwendige Grundvoraussetzung darstellte.

*Markierungsreaktionen der C-terminal modifizierten **HSP**-Varianten*

Im Anschluss an die erfolgreiche Markierung des *N*-terminal modifizierten **cA-HSP** wurde nun die zuvor konstruierte *C*-terminale Variante **HSP-cA** auf die Möglichkeit zur Templat-vermittelten Markierung begutachtet (Abbildung 43a). Hierbei war besonders interessant, inwieweit das in der Verknüpfungsreaktion involvierte Cystein durch das nun *N*-terminal ständige **HSP** in seiner Reaktivität bzw. Zugänglichkeit beeinträchtigt war. Dabei wurde auch hier eine Alanin-Mutante **HSP-_ΔA** als Vergleich herangezogen. Die Durchführung erfolgte analog zu den zuvor getesteten *N*-terminalen **HSP**-Varianten. Zur Visualisierung der erfolgreichen Markierung von **HSP** wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzdetektion und finaler Coomassie-Färbung durchgeführt (Abbildung 43b).

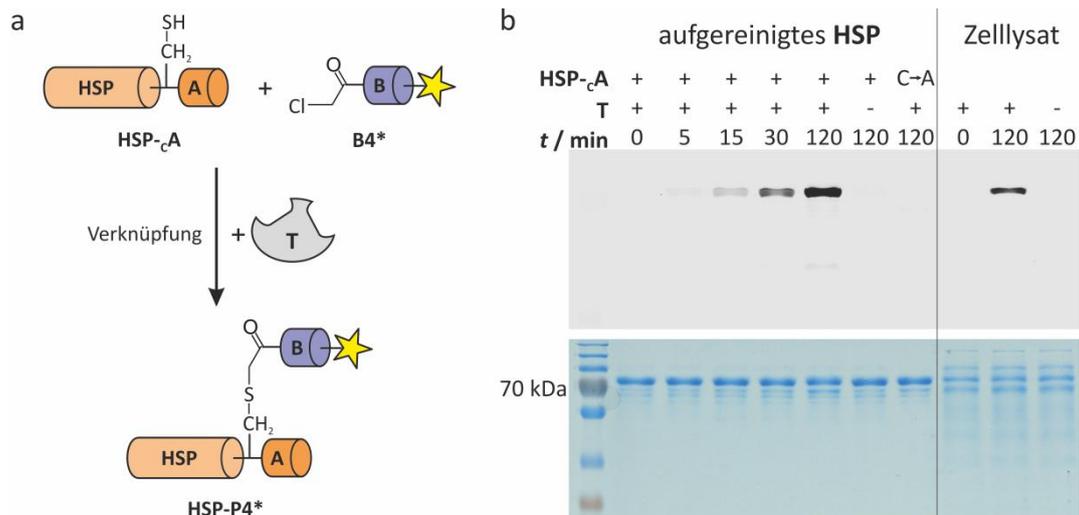


Abbildung 43: a) Prinzip der Verknüpfungsreaktion zur C-terminalen Markierung von **HSP-cA**. b) Fluoreszenzbild (oben) und Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (unten) der Markierungsreaktion der zwei C-terminal modifizierten **HSP-cA**- bzw. **HSP-A**-Varianten von aufgereinigtem **HSP** (links) und ganzem Zelllysate (rechts).

Wie zuvor für **cA-HSP**, konnte auch hier eine deutliche zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität für das aufgereinigte **HSP-cA** beobachtet werden (Abbildung 43b, oben, linke Spalte). Dabei scheint das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzbande nach 120 min im Verhältnis zur zugehörigen Coomassie-gefärbten Proteinbande (Abbildung 43b, unten) stärker zu sein als für das N-terminal modifizierte **HSP**-Konstrukt. Für die Probe, bei der kein Templat während der Verknüpfungsreaktion zugegen war (-T), konnte auch nach 120 min kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Dies entspricht den Erwartungen bezüglich Templat-unvermittelter Reaktionen bei solch niedrigen Eduktkonzentrationen. Auch für die mit Alanin mutierte Variante **HSP-AA** konnte selbst nach der maximal gemessenen Reaktionszeit von 120 min keine Fluoreszenz nachgewiesen werden, was die ausschließliche Beteiligung des N-terminal an A addierten Cysteins innerhalb der Verknüpfungsreaktionen bestätigt. Innerhalb der Verknüpfungsreaktion von **HSP-cA** mit **B4*** in Zelllysate konnte lediglich in Gegenwart des Templats **T** ein Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abbildung 43b, oben rechts). Die Tatsache, dass sowohl für die N- als auch für die C-terminal modifizierten **HSP**-Konstrukte **HSP-cA** und **cA-HSP** ausschließlich Fluoreszenzsignale unter der Verwendung von **T** zu detektieren waren, und dies sogar in Gegenwart von Zelllysate, unterstreicht zum einen den Vorteil von Reaktionsdurchführungen

unter Einsatz von Templaten und verdeutlicht zum anderen erneut die Selektivität des hier verwendeten Modellsystems **A·T·B**.

3.2 Versuche zur Templat-vermittelten Transferreaktion

Innerhalb der Verknüpfungsreaktion konnte bereits ein deutlicher Effekt durch den Einsatz von **T** an den Beispielen **B1*** und **B4*** nachgewiesen werden. Trotz der hohen Anfangsgeschwindigkeiten und der bestätigten Anwendbarkeit des bisher verwendeten Reaktionsmodells zur Templat-vermittelten Verknüpfung zweier Peptidliganden konnte keine katalytische Aktivität des Proteintemplats beobachtet werden. Entscheidend für eine katalytische Aktivität ist eine möglichst hohe Austauschrate. Die fehlende katalytische Aktivität bei den Verknüpfungsreaktionen kann mit einer erhöhten Affinität des Ligationsprodukts, verglichen mit den Eduktpeptiden, erklärt werden.^[270-271] Dies wird als Produktinhibierung bezeichnet, welche verringert werden kann indem die Affinität des oder der Reaktionsprodukte zum Templat relativ zu den Edukten nicht zunimmt oder sogar abnimmt. Daher war die Erarbeitung eines alternativen Konzepts notwendig, welches keine Erhöhung der Affinität durch das Reaktionsprodukt bewirkt, um daraus Templat-vermittelte Reaktionen mit maximalen Austauschraten zu generieren.

Eine Möglichkeit, diese Voraussetzungen zu erfüllen, war die Verwendung einer Transferreaktion. Mit diesem Reaktionstyp kann z. B. eine Reportergruppe **F** von einem Donorliganden **D** auf einen Akzeptorliganden **A** übertragen werden. Hierbei sollten sich, anders als bei der Verknüpfungsreaktion, für die Produktliganden im Vergleich zu den Eduktliganden nahezu keine Affinitätsänderungen zu **T** ergeben. Somit konnte durch eine Transferreaktion ein erhöhter Austausch erwartet werden, wodurch **T** für weitere Reaktionszyklen zur Verfügung stünde. Auf diese Weise wäre bei hinreichend hoher Austauschrate der Produkt- zu Eduktliganden eine katalytische Reaktionskinetik denkbar. Ein weiterer Vorteil einer Transferreaktion wäre die Tatsache, dass bei einem Einsatz in späteren Markierungsreaktionen von Zielproteinen die Massezunahme deutlich geringer ausfiele, als bei der bisher verwendeten Verknüpfungsreaktion. Dies liegt darin begründet,

dass die Peptidsequenz von **D** und ggf. **T** nicht mehr zur finalen Zielproteinmasse beitragen, wie es für **B4*** in der Proteinmarkierung von **HSP** der Fall war.

3.2.1 Templat-vermittelter Transfer einer Reportergruppe (F)

Um die Effektivität der Transferreaktion auswerten zu können, sollte die zu übertragende Reportergruppe **F** mit einem Fluorophor markiert werden. Auf diese Weise kann der Fortschritt der Reaktion spektroskopisch verfolgt werden. Da die Tauglichkeit von FITC bereits in den durchgeführten Verknüpfungsreaktionen zur Markierung von **HSP** nachgewiesen wurde, sollte nun die Transferreaktion einer mit FITC-modifizierten Reportergruppe **F** von einem geeigneten Donorliganden **D** auf einen entsprechenden Akzeptorliganden **A** getestet werden. Zu diesem Zweck musste zunächst ein potentes Transfersystem erstellt werden.

Design der Templat-vermittelten Transferreaktionen

Durch den alleinigen Transfer von **F** wäre spektroskopisch keine Diskriminierung des Reaktionsfortschritts möglich, da die Gesamtfluoreszenz des Systems konstant bliebe. Daher müsste ein System konstruiert werden, in dem der Transfer von **F** eine simultane Intensitätsänderung der Gesamtfluoreszenz bewirkt. Eine Möglichkeit, die Änderung der Fluoreszenzintensität resultierend aus dem Transfer von **F** zu generieren, ist der zusätzliche Einsatz eines Fluoreszenz-löschenden Moleküls (Quencher, **Q**). Zu Versuchsbeginn müssten **F** und **Q** voneinander getrennt auf jeweils einer der zwei Peptidliganden (**A** und **D***) vorliegen. Erst durch den Transfer der Reportergruppe **F** von **D*** auf **A** kommt **F** in die Nähe von **Q**, wodurch das Fluoreszenzsignal vorwiegend durch Zusammenstöße zwischen **Q** und **F** (dynamisches Quenching) verringert oder gar ausgelöscht wird. Dies kann durch eine zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität verfolgt werden (Abbildung 44).

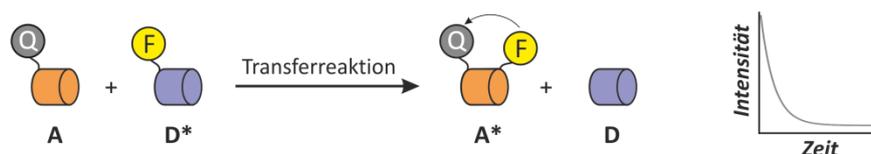


Abbildung 44: Konzept zur Verfolgung des Reportergruppentransfers vom Donor- **D** auf den Akzeptorliganden **A**. Der gebogene Pfeil deutet auf Fluoreszenzlöschung hin; * = Reportergruppe(**F**)-tragende Peptidsequenz.

Innerhalb der Modifikation von biokompatiblen Sonden hat sich das Prinzip der nativen chemischen Ligation (NCL) und seiner Varianten bereits mehrfach bewährt.^[71, 272-273] Bei der klassischen NCL handelt es sich um eine Reaktion, welche ursprünglich aufgrund der dabei entstehenden nativen Peptidbindung, zur Verknüpfung zweier Peptid- bzw. ganzer Proteinfragmente eingesetzt wurde.^[14, 274] In diesem Projekt erfolgte die Entwicklung eines Systems, welches die hohe Reaktionsgeschwindigkeit und die der NCL zugrunde liegenden Chemoselektivität nutzt (Abbildung 45a). Dabei sollte jedoch die finale Verknüpfung der Eduktliganden umgangen werden, um eine Erhöhung der Produktaffinität zum Templat zu verhindern. Aus diesem Grund wurde die Reportergruppe **F** über einen Thioester an ein *N*-terminal acetyliertes Cystein des Donorliganden geknüpft. Mithilfe des *N*-terminalen freien Cysteins von **A** könnte so ein reversibler Thiolaustausch durchgeführt werden, bei dem **F** auf **A** übertragen wird und **D** als Abgangsgruppe dient, und nicht mehr, wie **B4**, als elektrophile Falle (Abbildung 45b). Durch einen anschließenden S→N-Acyltransfer innerhalb des Cysteins könnte **F** irreversibel über eine Peptidbindung an **A** geknüpft werden. Dieses Konzept kam bereits bei Nukleinsäure-katalysierten Reaktionen zum Einsatz.^[275] Um den Templat-vermittelten Transfer von **F** mittels Fluoreszenzauslesung zu testen, wurden zunächst geeignete Donor- sowie Akzeptorliganden hergestellt. Für **D** wurde der innerhalb der Verknüpfungsreaktion eingesetzte Peptidligand **B0** als Ausgangssequenz verwendet und *N*-terminal mit einer FITC-enthaltenden Reportergruppe **F** modifiziert (**D***). Für den Akzeptorliganden diente die Peptidsequenz **A0** als Grundlage und wurde *C*-terminal durch das Quencher-molekül DABCYL (4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoyl, **Q**) erweitert.

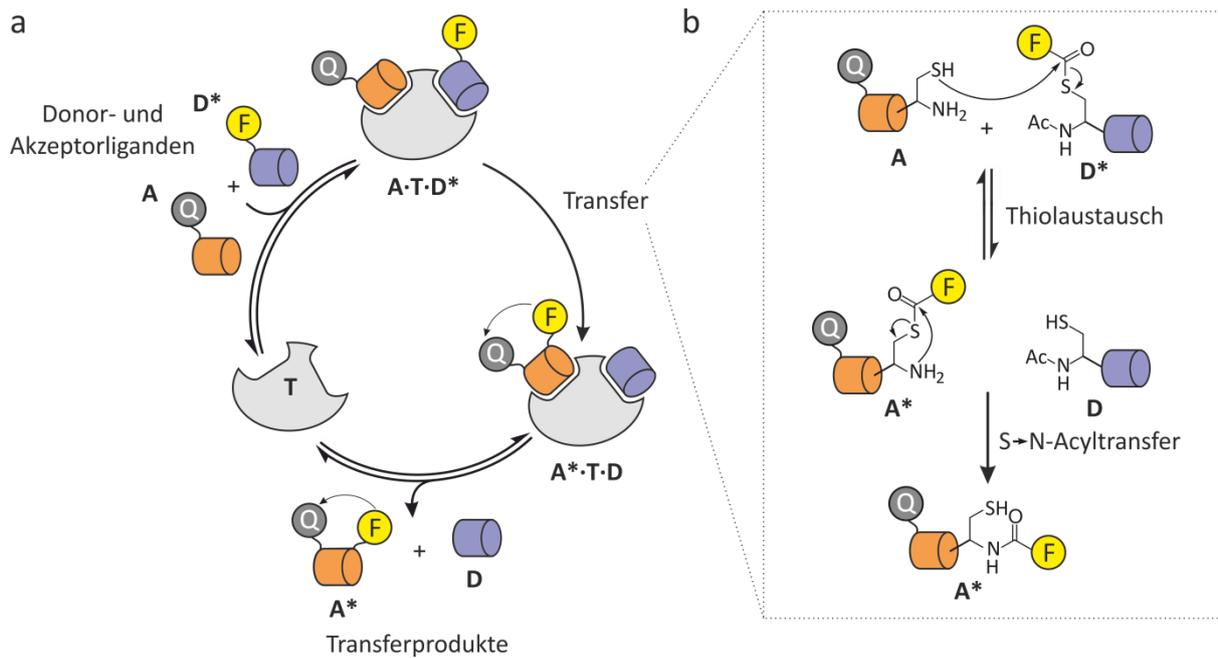


Abbildung 45: a) Prinzip der Templat-vermittelten Transferreaktion; **A** = Akzeptorligand, **D** = Donorligand, **T** = Templat, **Q** = Quencher (DABCYL), **F** = fluoreszente Reportergruppe, * = F-tragendes Molekül. Die Fluoreszenzlöschung ist durch einen gebogenen Pfeil zwischen **Q** und **F** symbolisiert. b) Allgemeiner Mechanismus der nativen chemischen Ligation (NCL) zum Transfer der Reportergruppe.

Synthese Alanin-mutierter Donor-Derivate

Da die bisher verwendete Sequenz von **B0** diverse nukleophile Ser- und Lysreste enthielt, wurden zunächst das Serin₁₂₁ in **B6** sowie die Lysine Lys₁₂₃ und Lys₁₃₆ in **B6** und **B7** als potentiell reaktive Reste gegen die inerte Aminosäure Ala substituiert (Abbildung 46a). Zu diesem Zweck wurden diese Varianten mittels Fmoc-basierter SPPS erstellt, N-terminal über eine PEG1-Einheit mit FITC markiert (**B6***/**B7***) und via semi-präparativer HPLC aufgereinigt (Abbildung 46b).

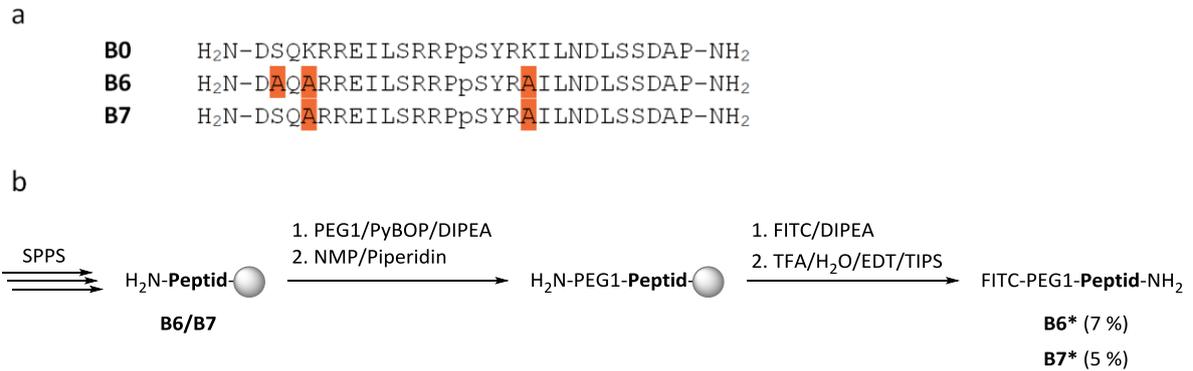


Abbildung 46: a) Übersicht der zwei mutierten Peptidsequenzen **B6** und **B7** im Vergleich mit der Wildtypsequenz **B0**. Die substituierten Positionen sind rot markiert. b) Syntheschema zur Herstellung der mit Alanin-mutierten Varianten von **B6** und **B7**; * = FITC-modifizierte Peptidsequenz. Die Ausbeuten sind in % angegeben.

Um den Einfluss der Mutationen auf die Bindungsaffinität des jeweiligen Peptids zum Templat **T** quantifizieren zu können, wurden **B6*** und **B7*** mit der bereits verwendeten Wildtypsequenz **B0*** innerhalb einer FP-Analyse vermessen und ausgewertet. Für die FP-Messung wurden alle verwendeten Peptide in einer finalen Konzentration von 20 nM in Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,01 % Tween-20, pH 7,5) eingesetzt. Dabei reichte die Konzentration von **T** von 120 μ M bis 0,7 nM. Eine erste Messung erfolgte nach 5 min und eine weitere nach 60 min Inkubation bei RT (Abbildung 47).

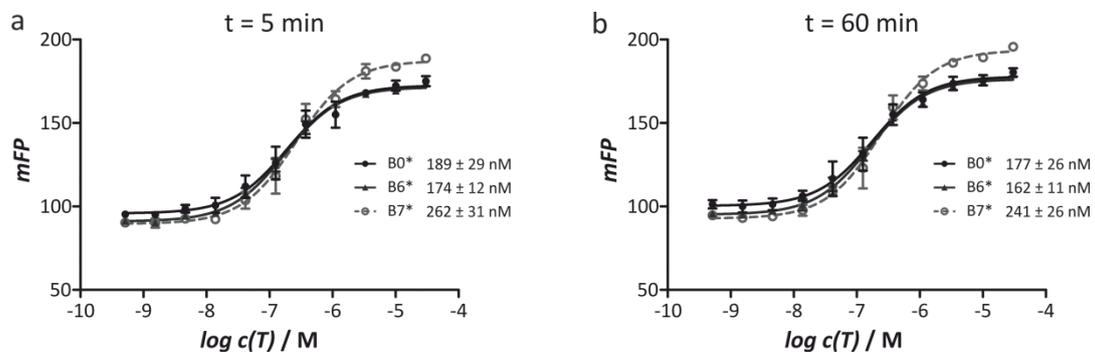


Abbildung 47: Fluoreszenzpolarisationsmessung der zwei mutierten Varianten **B6*** und **B7*** im Vergleich mit der Wildtypsequenz **B0*** nach a) 5 min und b) 60 min Inkubation bei RT. Der Fehler bezieht sich auf die Standardabweichung 1 σ .

Die 60-minütige Inkubation der Proben bei RT (Abbildung 47b) schien im Vergleich zum unmittelbar nach der Präparation gemessenen Ansatz (Abbildung 47a) keine signifikante Affinitätsänderung zu bewirken, da die Änderungen im Bereich des Messfehlers von 1 σ lagen. Dies bestätigte, dass auch das sequenziell modifizierte System weiterhin einer

schnellen Komplexbildung unterlag, was für die angestrebte katalytische Transferreaktion grundlegend war. Die Dreifachmutante **B6*** wies mit einem K_d von ca. 170 nM eine höhere Affinität zum Templat **T** als **B7*** ($K_d \approx 260$ nM), in dem zwei Lysine durch Alanine substituiert wurden. Zudem besitzt **B6*** eine ähnliche Affinität zu **T** wie **B0*** ($K_d \approx 190$ nM). Die absoluten Werte deuten auf eine leichte Affinitätssteigerung hin, die jedoch innerhalb des Messfehlers keine signifikanten Aussagen zuließ. Aufgrund der unveränderten Affinität im Vergleich zu **B0*** wurde die Dreifachmutante **B6** zur weiteren Konstruktion eines geeigneten Donors **D** für die geplanten Transferreaktionen verwendet, da sie die geringste Anzahl an reaktiven Seitenketten der hier getesteten Sequenzen aufwies.

Synthese der Reportergruppe F

Um die Transferreaktion verfolgen zu können, musste eine geeignete Reportergruppe erstellt werden, welche die Detektion der zu transferierenden Gruppe ermöglichte. Dabei musste **F** eine möglichst hohe Photostabilität aufweisen. Weiterhin war eine Bindung von **F** an **D** mittels eines Thioesters vorgesehen, um **F** via NCL auf den Akzeptorliganden zu transferieren. Um dies zu ermöglichen und simultan hinreichend Abstand zwischen dem Fluorophor (FITC) und der Donorsequenz **D** zu gewährleisten, sollte die Kupplung von FITC mithilfe einer Linkersequenz erfolgen. Diese sollte eine C-terminale Carbonsäure enthalten, um das gesamte Reportermolekül innerhalb der Fmoc-basierten SPPS über einen Thioester an den selektiv entschützbaeren Cysteinrest von **D** zu knüpfen. Um einen hinreichenden Abstand der fluoreszenten Einheit zum Peptid zu gewährleisten, wurde die 5-Aminovaleriansäure als Linker eingesetzt (Abbildung 48). Für die Synthese der Reportergruppen wurde FITC zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und tropfenweise zur jeweiligen in Puffer gelösten Linker-Einheit gegeben. Die Reaktion erfolgte unter Lichtausschluss bei 30 °C über Nacht (Kapitel 5.7). Anschließend wurde das Lösungsmittel per Rotationsverdampfer entfernt und das verbliebene Produkt mithilfe der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Die **F** konnte mit einer Ausbeute von 31 % hergestellt und isoliert werden. Im weiteren Verlauf sollte **F** für die geplante Transferreaktion an eine Donorsequenz **D** gekuppelt werden.

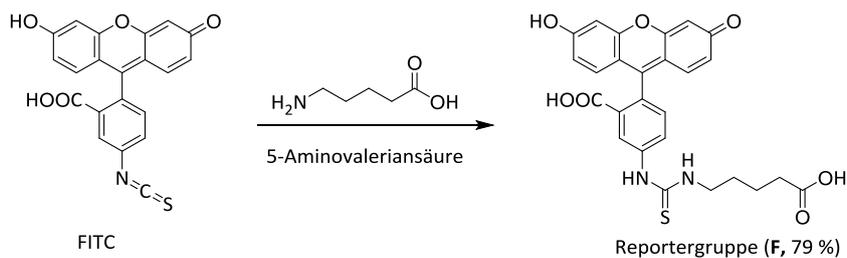


Abbildung 48: Syntheschema der Reportergruppen **F**. Die Ausbeute ist in % angegeben.

Synthese des Donorliganden **D*** für die Transferreaktion

Für die finale Transferreaktion war eine reversible Verknüpfung der jeweiligen Reportergruppe an den Donorliganden **D** notwendig. Aus diesem Grund sollte **F** als Thioester an die Thiofunktion des *N*-terminalen Cys von **D** geknüpft werden. Zu diesem Zweck wurde die zuvor gewählte Peptidsequenz **B6** *N*-terminal um ein 4-Monomethoxytrityl(Mmt)-geschütztes Cystein erweitert (**D**) und durch selektive Entschützung mit der jeweiligen Reportergruppe **F** (für **D***) modifiziert (Abbildung 49). Final wurde das Peptid mittels semi-präparativer HPLC isoliert. Da nun mit **D*** ein Donorligand zur Verfügung stand, wurden entsprechende Akzeptorliganden erstellt und validiert, um ein geeignetes Ligandenpaar für die Templat-vermittelte Transferreaktion zu erhalten.

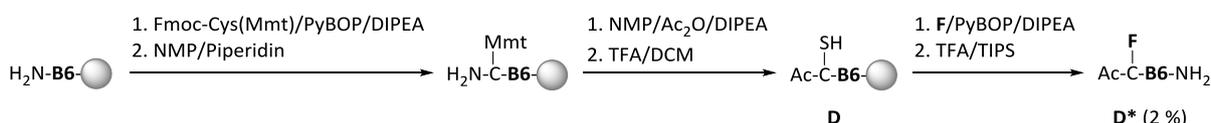


Abbildung 49: Fmoc-basierte SPPS des Donorliganden **D*** für die Templat-vermittelte Transferreaktion; **F** = Reportergruppe, * = **F**-tragende Peptidsequenz. Die Ausbeute ist in % angegeben.

Synthese *N*- und *C*-terminal verkürzter Akzeptorliganden **A2*** – **A4***

Um bereits zu Anfang eine möglichst kurze Akzeptorsequenz für die geplante Transferreaktion zu generieren, wurden verkürzte Varianten der bisher verwendeten Sequenz **A0** hergestellt und auf ihre Affinität zu **T** überprüft (Abbildung 50a). Zur *C*-terminalen Verkürzung wurden sukzessive die zwei Aminosäuren Pro2858 und Ser2859 eliminiert, die laut Literatur keine für die Affinität relevanten Bereiche darstellen.^[177, 185-187, 194] Zudem wurde das zuvor zu Analysezwecken eingefügte Tryptophan

(Trp, W) durch ein Mmt-geschütztes Lysin ersetzt (**A2** – **A4**). Dieses diente zur späteren Installation einer für die FP-Messungen benötigten FITC-Modifikation. Für spätere Transferreaktionen wurde diese Position zur Kupplung des Quencher-moleküls verwendet. Die Peptide wurden mittels Fmoc-basierter SPPS aufgebaut und final durch selektive Mmt-Entschützung des Lysins mit FITC markiert (**A2*** – **A4***, Abbildung 50b). Die Affinitäten der C-terminal verkürzten Peptide zu **T** wurden ebenfalls mittels FP-Messung untersucht, um die erwarteten unveränderten Affinitäten zu bestätigen. Alle drei mit FITC markierten Akzeptorliganden (**A2*** – **A4***) konnten ohne Komplikationen hergestellt und durch semi-präparative HPLC isoliert werden.

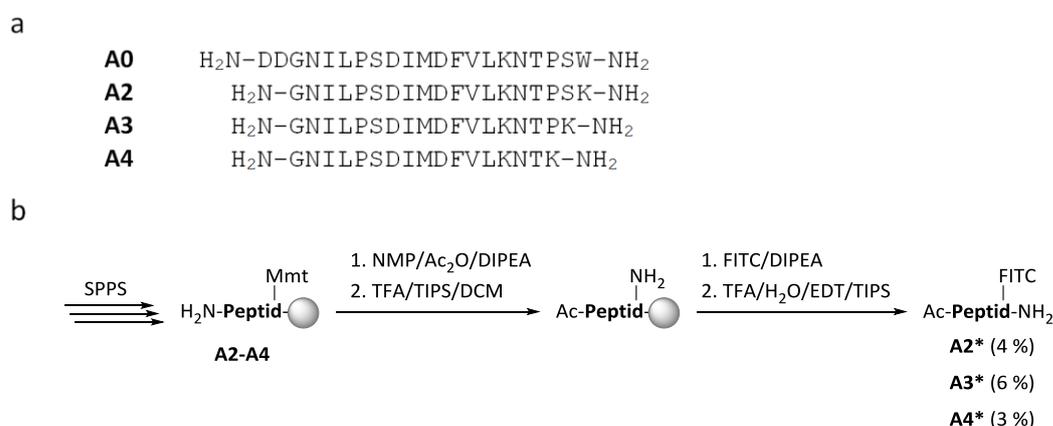


Abbildung 50: a) Sequenzvergleich der N- und C-terminal verkürzten Akzeptorliganden **A2** – **A4** im Vergleich zur Wildtypsequenz **A0**. b) Syntheschema zur Herstellung der N- und C-terminal verkürzten Akzeptorliganden **A2*** – **A4***; * = FITC-modifizierte Peptidsequenz. Die Ausbeuten sind in % angegeben.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der verkürzten Akzeptorvarianten **A2*** – **A4*** im Vergleich zur Referenzsequenz **A0*** mittels Fluoreszenzpolarisation wurden alle verwendeten Peptidliganden in einer finalen Konzentration von 20 nM in Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,01 % Tween-20, pH 7,5) eingesetzt. Die Konzentrationen von **T** reichten von maximal 120 µM bis minimal 0,7 nM. Eine erste Messung erfolgte nach 5 min, eine zweite nach 60 min Inkubation bei RT (Abbildung 51).

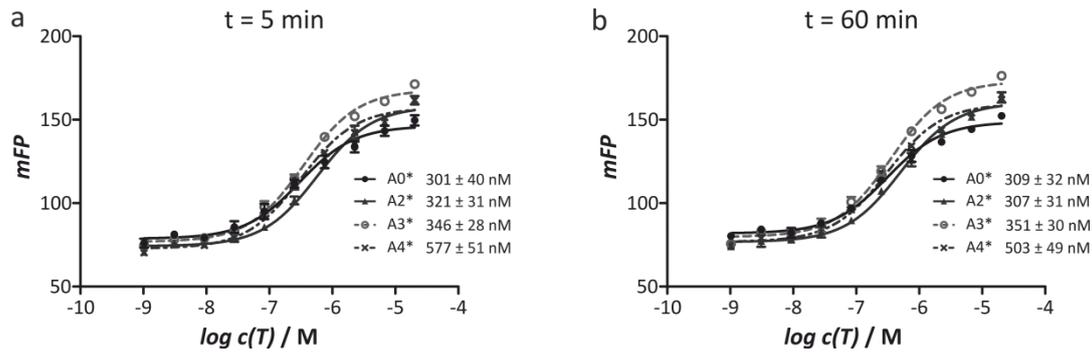


Abbildung 51: Fluoreszenzpolarisationsmessung der drei sukzessiv verkürzten Akzeptorliganden **A2*** – **A4*** im Vergleich mit der Wildtypsequenz **A0*** nach a) 5 min und b) 60 min Inkubation bei RT. Der Fehler bezieht sich auf die Standardabweichung 1σ .

Die Auswertungen zeigten einen geringen Zusammenhang zwischen dem C-Terminus und der Affinität. So besaßen die C-terminal längsten Varianten (**A0*** und **A2***) mit K_d -Werten von ca. 300 nM die höchsten Affinitäten. Diese nahmen mit zunehmender Verkürzung des C-Terminus ab (**A2*** < **A3*** < **A4***), sodass die kürzeste Variante **A4*** mit einem K_d von etwa 580 nM nach 5 min Inkubation um den Faktor zwei schlechter an **T** binden konnte, als **A0*** (Abbildung 51a). Insgesamt konnte der C-Terminus der Akzeptorliganden jedoch verkürzt werden, ohne erhebliche Affinitätsverluste zu erzeugen. Dieses Resultat deckte sich mit bereits publizierten Daten, in denen die zwei N-terminalen Asparaginsäuren Asp2840 und Asp2841 keine essenziellen Interaktionen mit **T** nahe legen.^[177, 185-187, 194] Aufgrund der durch die FP-Messungen erlangten Erkenntnisse über den geringen Einfluss der C-terminalen Verkürzung in Bezug auf die Affinität zu **T**, wurde die C-terminal kürzeste Peptidsequenz (**A4**) für das weitere Vorhaben verwendet. Für die Verkürzung des N-Terminus wurden keine erheblichen Affinitätsunterschiede der Akzeptorliganden zu **T** erwartet. Diese Annahme konnte durch den marginalen Affinitätsunterschied zwischen **A0*** und **A2*** bestätigt werden. Ein Vergleich der K_d -Werte nach 5 min und 60 min zeigten ähnliche Affinitäten, was erneut für ein schnelles und stabiles Einstellen des Gleichgewichts im dimeren Komplex sprach (Abbildung 51a und b).

Synthese der Akzeptorliganden **A5** und **A6**

Innerhalb der Transferreaktion sollte die bisher verwendete Akzeptorsequenz (**A5**) mit einer verkürzten Variante (**A6**) verglichen werden. Eine N-terminale Verkürzung der

Akzeptorsequenz barg die Gefahr, den Abstand zwischen den Liganden zu vergrößern. Bei zu großem Abstand zu einander könnte keine effiziente Transferreaktion erfolgen. Um den Einfluss der Eliminierungen bewerten zu können, wurden beide Akzeptorliganden (**A5** und **A6**) basierend auf der Sequenz von **A4** hergestellt (Abbildung 52). Die verkürzte Peptidsequenz hätte u. a. im Hinblick auf eine Verwendung des Modellsystems zur Markierung von Zielprotein den Vorteil, dass die resultierende Modifikation des POIs möglichst minimal ausfiele. Darüber hinaus könnten Erkenntnisse über die Toleranz des Modellsystems bezüglich Sequenzmodifikationen erhalten werden. Während die Sequenz von **A4** zur Erstellung der Variante **A5** um die zwei zuvor entfernten Aminosäuren Asp2840 und Asp2841 erweitert wurde, blieb sie für die Synthese von **A6** unverändert. Des Weiteren wurden beide Peptidliganden um ein *N*-terminales Cystein erweitert, welches innerhalb der Transferreaktionen als nukleophile Gruppe für die NCL dienen sollte. Final wurde das jeweilige *C*-terminale Lysin selektiv entschützt, um die Sequenzen mit dem bereits als Quencher-Einheit (**Q**) selegierten DABCYL zu versehen. Nach erfolgter SPPS wurden die Peptidsequenzen mittels semi-präparativer HPLC isoliert.

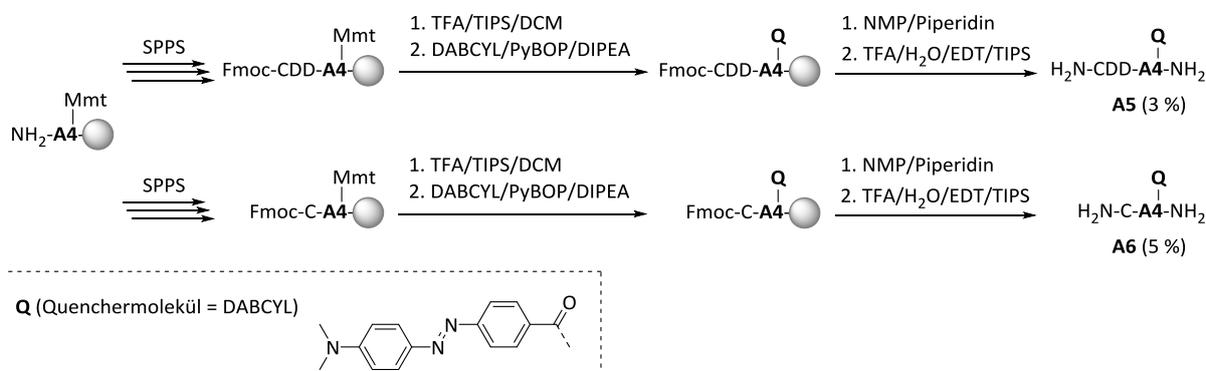


Abbildung 52: Fmoc-basierte SPPS der Akzeptorliganden **A5** und **A6** für die Templat-vermittelte Transferreaktion mit **A4**; **Q** = Quencher-molekül (DABCYL). Die Ausbeuten sind in % angegeben.

Templat-vermittelter Transfer einer Reportergruppe

Nachdem die Peptidliganden **D***, **A5** und **A6** hergestellt wurden, erfolgte ein initialer HPLC-basierter Transfertest am Beispiel von **A5** und **D***. Hierbei sollten im Gegensatz zur Verknüpfungsreaktion nun zwei Produktsignale entstehen, da beide zu erwartenden Produktliganden **D** und **A5*** bei der verwendeten Wellenlänge von $\lambda = 210$ nm ein Signal

ergeben. Für den initialen Transferrest wurde **A5** zunächst für 30 min bei 30 °C in Gegenwart von TCEP vor-inkubiert. Zum Start der Reaktionen wurden die Komponenten zusammen gegeben, um eine Reaktionslösung bestehend aus 5 μM **A5**, 2,5 μM **D*** und ggf. 2,5 μM **T** zu erhalten (Kapitel 5.10.2). Die Reaktionen erfolgten in Natriumphosphatpuffer bei pH 7,4 und 30 °C. Nachdem die Reaktionsansätze zu Beginn und nach 2 h Inkubation mithilfe von TFA gestoppt wurden, erfolgte deren Vermessung und Analyse via analytischer HPLC/MS (Abbildung 53).

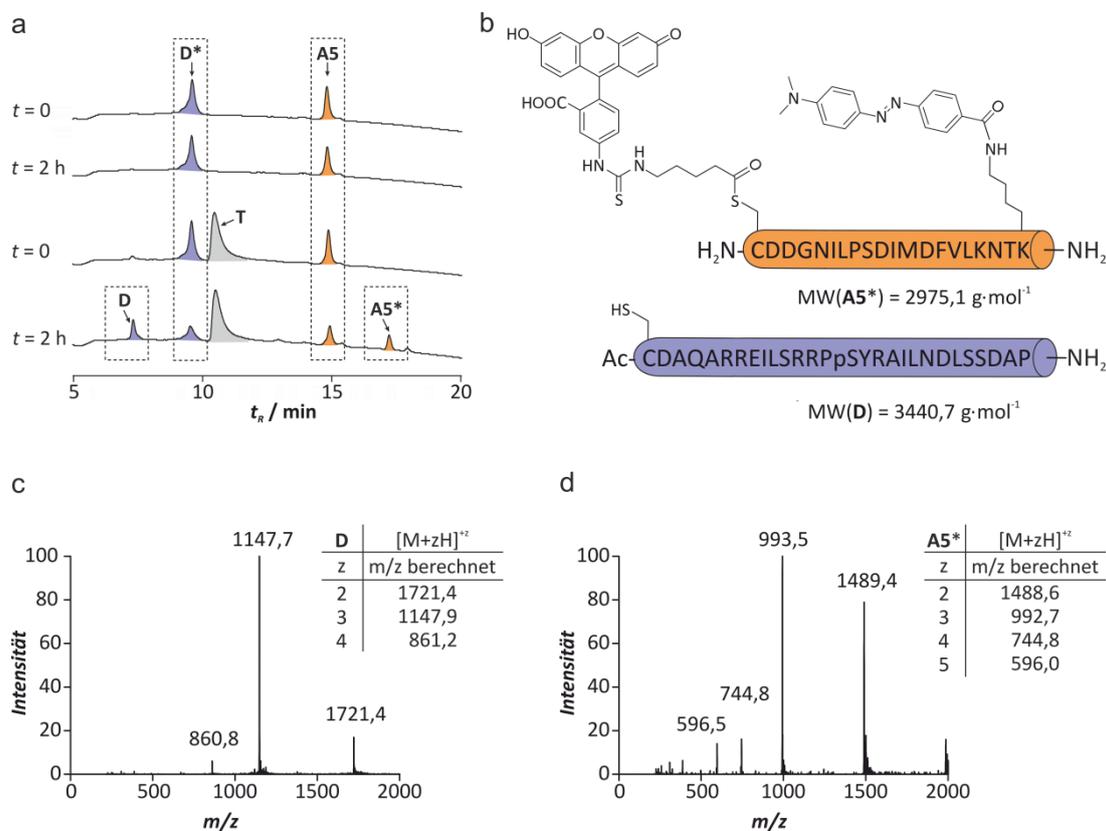


Abbildung 53: a) HPLC-Chromatogramme der Transferreaktion von **D*** (blau) und **A5** (orange) in Ab-(oben) und Anwesenheit (unten) von Templat **T** (grau) bei pH 7,4 zum Zeitpunkt $t = 0$ und $t = 2$ h. Innerhalb dieser Messung wurde der Gradient 9 verwendet. Die Transferprodukte **D** und **A5*** sind markiert. b) Strukturen der erwarteten Produkte mit den berechneten Molmassen $M(\text{A5}^*) = 2975,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $M(\text{D}) = 3440,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. c) ESI-Spektrum des erhaltenen Transferprodukts **D**. d) ESI-Spektrum des erhaltenen Transferprodukts **A5***.

Für die Reaktion in Abwesenheit von **T** konnten nach 2 h keine hinzukommenden Signale beobachtet werden (Abbildung 53a, oben). Im Vergleich dazu wurden in Gegenwart von **T** zwei neu entstandene Signale sowie die Intensitätsabnahme der Eduktliganden **D*** und **A5** detektiert. Mithilfe des an der HPLC gekoppelten ESI-MS-Systems konnten die neu entstandenen Signale den erwarteten Produktliganden **D** und **A5*** zugeordnet werden

(Abbildung 53b – d). Die Ausbeute betrug nach 2 h Reaktionszeit, bezogen auf die Signalflächen von **D** und **D***, ca. 47 % (Details siehe Kapitel 5.10.2). Vor dem Hintergrund der erfolgreich nachgewiesenen Transferreaktion in Gegenwart von **T** wurden nachfolgend kinetische Studien unter Verwendung von **D*** und **A5** sowie des kürzeren Peptidliganden **A6** durchgeführt.

Untersuchung möglicher Katalyse mittels Templat-vermittelter Transfers

Zur Verifizierung der katalytischen Aktivität von **T** erfolgte eine Templat-vermittelte Transferreaktion der Reportergruppe **F** von **D*** auf **A5** und **A6**. Daher wurden Reaktionsansätze erstellt, in denen die Konzentrationen beider Eduktliganden konstant und lediglich die Menge eingesetzten **Ts** variiert wurde. Zu diesem Zweck wurde die Fluoreszenzlöschung der Transferreaktion unter Verwendung substöchiometrischer Mengen **T** vermessen ($X \text{ Äq. T}$). Zunächst wurde die Transferreaktion für den Akzeptor **A5** durchgeführt, da hierfür bereits der erfolgreiche Transfer mittels HPLC-MS nachgewiesen wurde. Zu diesem Zweck wurden 10 μl **A5** (20 μM **A5** in 500 μM TCEP-Puffer) in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Zudem wurden Donorstocks mit 10 μM **D*** in Gegenwart und Abwesenheit unterschiedlicher Äq. **T** erstellt ($\text{D}^* \pm X \text{ Äq. T}$ mit $X = 0, 0,05, 0,1, 0,25$ und 1). Zum Start der Reaktionen wurden zu den 10 μl **A5** 10 μl des jeweiligen $\text{D}^* \pm \text{T}$ -Stocks zugegeben. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 5 h bei 30 °C vermessen. Die Messungen erfolgten mittels Mikrotiterplattenlesegerät in Intervallen von je 2 min. Zur Berücksichtigung des Hintergrundsignals wurde eine Referenzprobe, die ausschließlich eine äquivalente Menge an **D*** enthielt, erstellt. Somit konnten relative Intensitäten ($I_{\text{rel.}}$) der Messansätze ermittelt werden (Abbildung 54a). Bedingt durch die zeitliche Verzögerung, aufgrund technischer Gegebenheiten, konnte die Messung erst nach einer Inkubation von 2 min durchgeführt werden. Somit konnte die bis dahin erfolgte Fluoreszenzlöschung zur Berechnung der Kinetiken nicht berücksichtigt werden.

Anschließend erfolgte die Berechnung der Ausbeuten (η) über die jeweilige zeitabhängige Fluoreszenzlöschung (Abbildung 54b und Abbildung 55b). Basierend auf diesen Ausbeuten wurden die Anfangsgeschwindigkeiten (v) im Verhältnis zu 1 Äq. **T** sowie die Wechselzahl ($\text{WZ} = [\eta(X \text{ Äq. T}) - \eta(\text{ohne T})] \cdot X^{-1}$) in Abhängigkeit des Reaktionsverlaufs bestimmt

(Abbildung 54c/d und Abbildung 55c/d). Die WZ gibt die Anzahl an katalysierten Reaktionen pro katalytischer Einheit an. Sie ist somit ein direktes Maß für die Effizienz einer katalysierten Reaktion. Da das Proteintemplat **T** ein katalytisches Zentrum bezüglich der Bindung eines Donor-Akzeptor-Paars aufweist, wurde dem zugehörigen Term ein Wert von 1 zugesprochen. Die Rohdaten der Reaktionskinetik sind dem Kapitel 9.9 beigefügt. Die Details zur Prozessierung der erhaltenen Datenpunkte sind dem Kapitel 5.10.2 zu entnehmen.

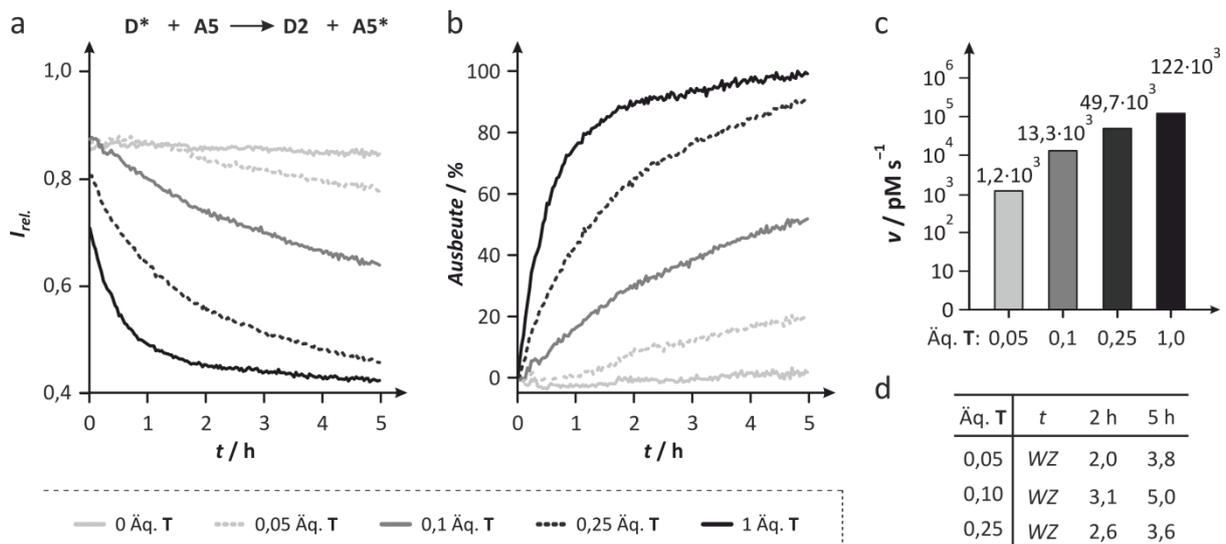


Abbildung 54: Kinetik der Fluoreszenzlöschung mittels Proteintemplat-vermittelter Transferreaktion zwischen **D*** und **A5** in Gegenwart von substöchiometrischen Mengen an **T**. a) Relative Fluoreszenzintensitäten $I_{rel.}$ in Abhängigkeit von 0 – 1 Äq. **T**. b) Ausbeute η der Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von 0 – 1 Äq. **T**. c) Anfangsgeschwindigkeiten v für 0,05 Äq., 0,1 Äq., 0,25 Äq. und 1 Äq. **T**. d) Wechselzahlen WZ nach $t = 2$ h und $t = 5$ h Reaktion in Gegenwart von 0,05 Äq., 0,1 Äq. und 0,25 Äq. **T**.

Die relativen Intensitäten zeigten eine Abhängigkeit zur eingesetzten Templatmenge. Dabei konnte mit einer Ausbeute von ca. 90 % nach 5 h eine ähnliche Fluoreszenzlöschung für 0,25 Äq. **T** erzielt werden, wie für 1 Äq. **T** (98 %) (Abbildung 54a). Deutlichere Unterschiede ergaben sich mit zunehmender Verringerung der Templatkonzentration ($I_{rel.}$: 0,1 Äq. **T** > 0,05 Äq. **T**). Eine analoge Tendenz wurde für die Ausbeuten (η) sowie für die Anfangsgeschwindigkeiten (v) beobachtet (Abbildung 54b und c). Sämtliche substöchiometrischen Ansätze waren mit Werten von $v = 1,2 \cdot 10^3 - 49,7 \cdot 10^3 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$ um den Faktor 2,4 (0,25 Äq. **T**) bis Faktor 100 (0,05 Äq. **T**) langsamer als die Reaktion, in der 1 Äq. **T** zugegen war ($v = 122 \cdot 10^3 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$). Trotz deutlich geringerer Gesamtausbeuten mit abnehmender Menge

an **T** deutete der Verlauf ein überproportionales Reaktionsverhalten und somit katalytische Aktivität an (Abbildung 54b). Durch die Berechnung der Wechselzahlen wurde diese Annahme bestätigt. So konnte für 0,1 Äq. **T** nach 2 h eine WZ von 3,1 und nach 5 h eine WZ von 5,0 bestimmt werden. Sowohl die Ausbeutendiagramme als auch die zeitliche Tendenz der WZ wiesen darauf hin, dass für längere Messperioden oder Erhöhung der Ligandenkonzentrationen höhere Ausbeuten und Wechselzahlen erhalten werden könnten. Diese Annahme sollte zukünftig in Folgeprojekten untersucht werden.

Nachdem für das Ligandenpaar **D*** und **A5** eine katalytische Aktivität der Templat-vermittelten Fluoreszenzlöschung durch den Transfer von **F** nachgewiesen werden konnte, wurde die kürzere Akzeptorvariante **A6** zusammen mit **D*** untersucht (Abbildung 55). Zu diesem Zweck wurden die Fluoreszenzmessungen für das Ligandenpaar **D*** und **A6** analog zu **A5** unter Verwendung identischer Konzentrationen und Probenvolumina durchgeführt. Die Messung erfolgte für 5 h bei 30 °C.

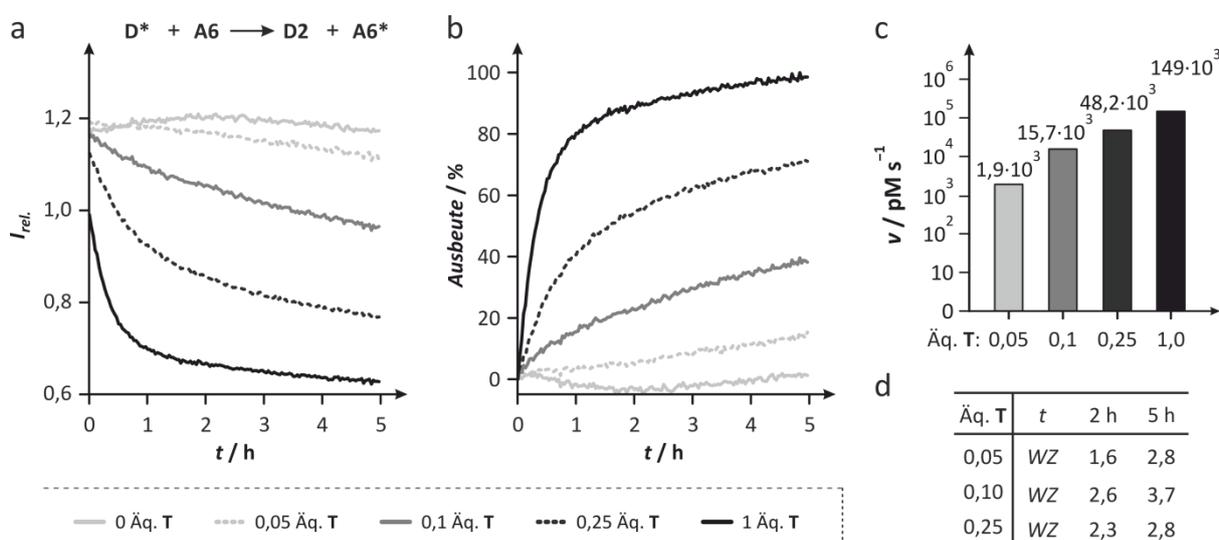


Abbildung 55: Kinetik der Fluoreszenzlöschung mittels Proteintemplat-vermittelter Transferreaktion zwischen **D*** und **A6** in Gegenwart von substöchiometrischen Mengen an **T**. a) Relative Fluoreszenzintensitäten $I_{rel.}$ in Abhängigkeit von 0–1 Äq. **T**. b) Ausbeute η der Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von 0–1 Äq. **T**. c) Anfangsgeschwindigkeiten v für 0,05 Äq., 0,1 Äq., 0,25 Äq. und 1 Äq. **T**. d) Wechselzahlen WZ nach $t = 2$ h und $t = 5$ h Reaktion in Gegenwart von 0,05 Äq., 0,1 Äq. und 0,25 Äq. **T**.

Wie für **A5** konnte auch für **A6** eine Abhängigkeit der relativen Intensitäten von der eingesetzten Templatmenge beobachtet werden (Abbildung 55a). Anders als für **A5** konnten hier selbst für lange Messzeiten keine Ausbeuten für 0,25 Äq. **T** erzielt werden, wie für

1 Äq. **T** (Abbildung 54b). So fiel die Ausbeute mit ca. 71 % (0,25 Äq. **T**) im Vergleich zu 98 % (1 Äq. **T**) geringer aus als für **A5** beobachtet wurde ($\approx 90\%$). Dies könnte für eine verminderte Reaktivität der verkürzten Variante **A6** im Vergleich zu **A5** sprechen. Auch die niederäquivalenten Ansätze zeigten mit 38 % (0,1 Äq. **T**) und 15 % (0,05 Äq. **T**) nach 5 h Messzeit geringere Ausbeuten als die analogen Messungen von **A5**. Hierbei war die Diskrepanz jedoch geringer als für 0,25 Äq. **T**. Die Fluoreszenzlöschung von ca. 40 % für 0,1 Äq. **T** wies, trotz geringerer Gesamtausbeuten, auf katalytische Umsätze hin. Ein Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten zeigt zudem ähnliche Dimensionen und Tendenzen, wie sie für **A6** beobachtet wurden (Abbildung 54c). Die Probe, in der 1 Äq. **T** zugegen war, zeigte mit $v = 149 \cdot 10^3 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$ im Vergleich zu den substöchiometrischen Ansätzen eine 3 – 78-fach höhere Anfangsgeschwindigkeit ($48,2 \cdot 10^3 - 15,7 \cdot 10^3 \text{ pM} \cdot \text{s}^{-1}$). Mit Wechselzahlen von $WZ = 2,6$ nach 2 h und $WZ = 3,7$ nach 5 h wies die Probe mit 0,1 Äq. **T** die größten Werte innerhalb der Messreihe für **A6** auf. Sämtliche erhaltene Wechselzahlen wiesen jedoch geringere Werte auf, als die entsprechenden WZ , die zuvor für den Akzeptorliganden **A5** ermittelt wurden.

3.2.2 Proteinmarkierung mittels Templat-vermittelter Transferreaktion

Da bereits die Verknüpfungsreaktion erfolgreich zur Markierung von **HSP** eingesetzt werden konnte, wurde nun die Anwendbarkeit der Templat-vermittelten Transferreaktion zur selektiven Markierung eines Zielproteins untersucht. Neben der schnelleren Reaktionskinetik hätte die Transferreaktion in Bezug auf die Markierung von Zielprotein den Vorteil, dass das Zielprotein lediglich um den Akzeptorliganden erweitert werden würde und nicht, wie im Falle von Verknüpfungsreaktionen, um das gesamte Verknüpfungsprodukt. Dies stellte hinsichtlich des Strebens nach möglichst minimalen Veränderungen des endogenen Systems eine potentielle Verbesserung dar.^[2, 4, 12, 44] Da die sequenzoptimierte Firefly Luciferase Luc2^[276-277] (**Luc**) aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* innerhalb diverser Reporterassays eingesetzt wird,^[278-279] konnte von einer problemlosen Darstellung ausgegangen werden. Daher wurde **Luc** als Zielprotein N-terminal an die Akzeptorsequenz **A4** fusioniert (Abbildung 56a), um diese mithilfe von **D*** mit **F** zu markieren. Um die Massenzunahme des Zielproteins minimal zu halten, wurde das C-terminale Lysin aus **A4** entfernt, da es lediglich zur Kupplung von FITC bzw. DABCYL diente.

Herstellung einer N-terminal mit Akzeptorliganden fusionierten Luciferase-Variante

Zu Beginn erfolgte die Isolierung und Amplifikation der Zielgenesequenz *luc2* (**luc**) aus dem Ausgangsvektor pGL4.10[luc2] der Firma Promega unter Zuhilfenahme von P16 und P17 innerhalb einer PCR. Anschließend wurde das Amplifikat mithilfe von *NdeI* und *XhoI* per IVC in den pET-28a(+)-Vektor kloniert. Zur Erstellung des Konstrukts **K7** wurde der Zielvektor mit *NcoI* und *NdeI* geschnitten und die für **A** kodierende DNA-Sequenz **a** durch einen gBlock (gB4) über IVC eingefügt (**A-Luc**). Als Linker wurde eine TEV-Proteaseerkennungssequenz zwischen das N-terminal fusionierte GST und **A-Luc** verwendet. Diese wurde bei dem Design des gBlocks derart modifiziert, dass durch den Proteaseverdau ein N-terminales Cystein mit freiem primärem Amin an **A-Luc** generiert würde (**cA-Luc**).^[280] Dieses war innerhalb der Proteinmarkierung nach dem Prinzip der NCL für den finalen S→N-Acyltransfer erforderlich (Abbildung 45b).

Zusätzlich wurde durch das Einfügen von gB4 das im pET-28a(+)-Vektor ursprünglich enthaltene N-terminale His₆-Tag durch ein GST-Tag ausgetauscht, da dieses zum einen die Löslichkeit der zu exprimierenden **cA-Luc** erhöhte und zum anderen die Aufreinigung mittels GSH-basierter Affinitätschromatographie verbessern sollte. Nach Verifikation des korrekten Zielkonstrukts mittels DNA-Sequenzierung unter Verwendung von P01, P02, P18 und P19 wurde **cA-Luc** mittels *E. coli*-BL12-Zellen exprimiert. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe eines Hochdruckhomogenisators. Während der anschließenden Aufreinigung wurde der GST-Tag auf der Säule durch TEV-Protease vom Zielprotein abgespalten, sodass das freie N-terminale Cys entstand und simultan die Elution von **cA-Luc** von der Säule erfolgte (Abbildung 56b, Bahn 6). Das Eluat wurde anschließend über eine Größenausschlusschromatographie von verbliebener TEV-Protease (MW ≈ 25 kDa), die sich nicht vollständig mittels GSH-Säule entfernen ließ, isoliert (Abbildung 56b, Bahn 6). Die Fraktionen, die reine **cA-Luc** enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration aufkonzentriert, bis die Probe eine Zielproteinkonzentration von ca. 2 mM besaß (Abbildung 56c). Das Resultat der Expression war eine, im Vergleich zu den restlichen Komponenten, dominante Bande in Höhe des erwarteten an GST fusionierten Zielproteins **cA-Luc** von ca. 88 kDa (Abbildung 56a, Bahn 2), sodass von einer erfolgreichen Expression ausgegangen werden konnte. Durch die anschließende Aufreinigung und Entfernung des GST-Tags konnte eine einzelne Bande in

erwarteter Massenhöhe von ca. 64 kDa auf dem SDS-Gel erhalten werden, welche dem reinen ζ A-Luc entspricht.

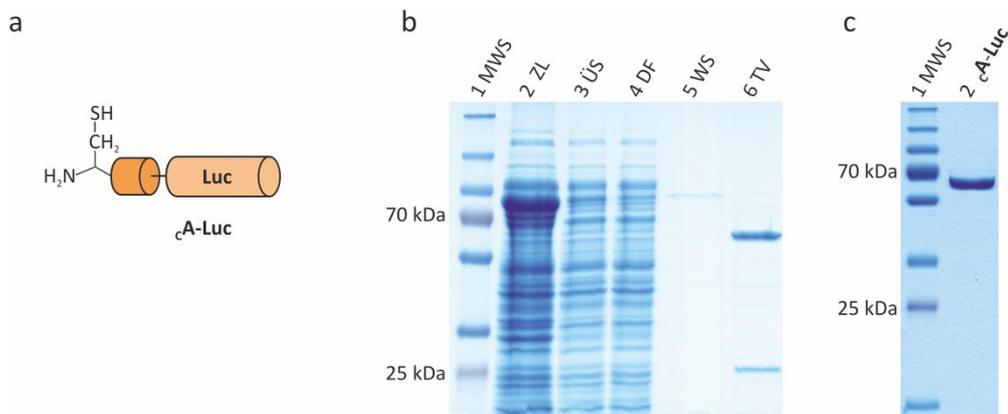


Abbildung 56: SDS-PAGE-Gel der aufgereinigten ζ A-Luc. a) Darstellung der mit ζ A fusionierten Luciferase ζ A-Luc. b) Aufreinigungsverlauf von ζ A-Luc; Bahn 1 = MWS (molekularer Standardmarker), Bahn 2 = ZL (aufgeschlossenes Zelllysats), Bahn 3 = ÜS (Überstand des Zelllysats nach Zentrifugation), Bahn 4 = DF (Durchfluss auf Ni-NTA-Säule), Bahn 5 = WS (Waschschrift auf Ni-NTA-Säule), Bahn 6 = TV (Probe nach Verdau mit TEV-Protease). c) Finale ζ A-Luc-Probe nach Aufreinigung und Gelfiltration; Bahn 1 = MWS, Bahn 2 = aufgereinigte ζ A-Luc nach Größenausschlusschromatographie.

Markierungsreaktion der N-terminal mit Akzeptorliganden modifizierten Luc

Für die Markierung aufgereinigten Zielproteins wurde ζ A-Luc auf eine Konzentration von 2 μ M verdünnt und für 30 min in TCEP-haltigem Puffer (20 mM mit 500 μ M TCEP, pH 7,4) inkubiert. Anschließend wurden sie in einem Verhältnis von eins zu eins mit einer gepufferten Lösung FITC-markierten Peptids **B4*** (2 μ M) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 1 Äq. Proteintemplat (\pm T) vermischt, sodass die finale Konzentration der drei Komponenten 1 μ M betrug. Die Reaktionslösung wurde bei 30 °C inkubiert. Um den zeitlichen Verlauf des Transfers verfolgen zu können, wurden dem Ansatz Aliquote zu definierten Zeitpunkten entnommen. Zur Visualisierung der erfolgreichen Markierung von ζ A-Luc mittels der Reportergruppe F wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Das resultierende SDS-Gel wurde via Fluoreszenzlesegerät ausgelesen (Abbildung 57b, oben) und anschließend mittels Coomassie-Färbung eingefärbt und ausgewertet (Abbildung 57b, unten).

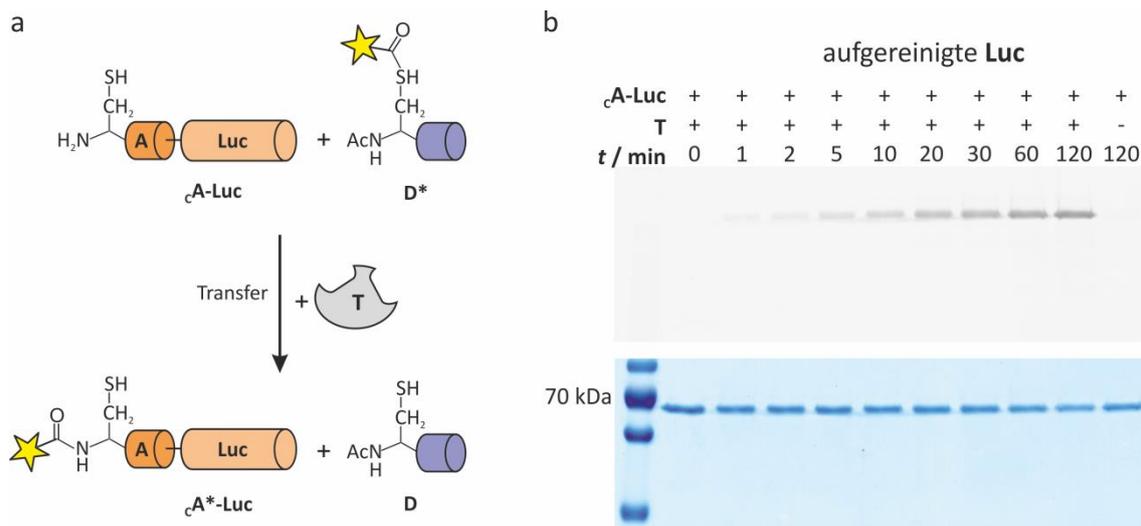


Abbildung 57: a) Prinzip der Templat-vermittelten Markierung von cA -Luc durch Transferreaktion zwischen cA und D^* . b) Fluoreszenzbild (oben) und SDS-PAGE-Gel (unten) der Markierungsreaktion von cA -Luc mittels Templat-vermitteltem Transfer der Reportergruppe F; * = F modifiziertes Molekül.

Im Gegensatz zum Ansatz, in dem kein **T** während der Inkubation anwesend war (Abbildung 57b, -**T**), konnte in Gegenwart von **T** eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität innerhalb der getesteten Zeitpunkte beobachtet werden (Abbildung 57b, +**T**). Auch nach maximal getesteter Reaktionszeit von 120 min konnte für die Templat-unvermittelte Reaktion keine Fluoreszenz beobachtet werden. Im Vergleich dazu war für die Reaktion in Gegenwart von **T** bereits nach 1 min ein schwaches Fluoreszenzsignal zu erkennen, welches mit steigender Inkubationszeit stetig anstieg. Dies sprach für eine zeitabhängige Zunahme an mit **F** markiertem Zielprotein cA^* -Luc und somit für eine erfolgreiche Templat-vermittelte Transferreaktion zwischen D^* und cA -Luc (Abbildung 57a). Das entsprechende mit Coomassie gefärbte SDS-Gel (Abbildung 57b, unten) bestätigt das Beladen der Geltaschen mit äquivalenten Mengen an Zielprotein, was für den Vergleich der detektierten Fluoreszenzsignale grundlegend war. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das mittels TEV-Protease generierte N-terminale Cystein in cA -Luc ein freies Amin besaß, da andernfalls statt einer Amidbindung ein reversibler Thioester zwischen cA -Luc und **F** entstünde. Dieser wäre bereits während des Aufkochens der Probe in 4x SDS-Probenladepuffer durch das enthaltende 4% β -Mercaptoethanol thiolysiert worden, wodurch keine Detektion von Fluoreszenzsignalen mehr möglich gewesen wäre.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Die Regulierung der Selektivität und Geschwindigkeit chemischer Reaktionen ist eine besondere Herausforderung innerhalb der naturwissenschaftlichen Forschung. Ein attraktives Konzept ist die Verwendung Templat-gestützter Reaktionen. Hierbei wird durch die Bindung zweier Liganden an dasselbe Templat eine räumliche Nähe der reaktiven Gruppen zu einander geschaffen, wodurch deren effektive Konzentrationen zunehmen. Auf diese Weise erfolgen chemische Transformationen bereits bei niedrigen Konzentrationen, bei denen unvermittelte Prozesse allenfalls langsam ablaufen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Konzipierung eines Systems zur Proteintemplat-vermittelten Reaktion zweier Peptidliganden und der Untersuchung seiner Anwendbarkeit zur selektiven Modifikation von Zielproteinen. Zu diesem Zweck wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein Modellsystem bestehend aus dem Proteintemplat **T** und zwei Peptidliganden **A** und **B** ermittelt (Abbildung 58).

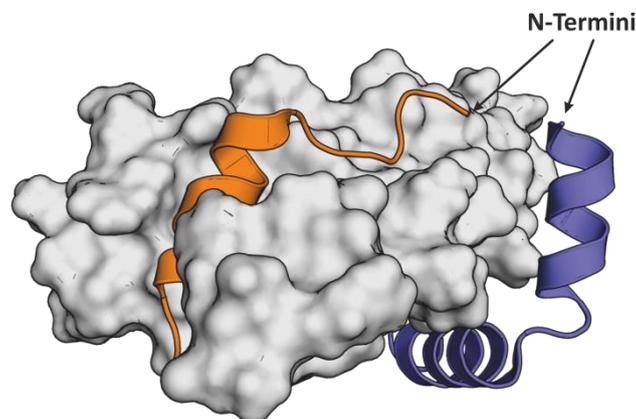


Abbildung 58: NMR-Struktur (PDB 2LXT)^[177] des Proteintemplats **T** (grau) im Komplex mit den zwei Peptiden **A** (orange) und **B** (blau).

Nachdem die korrekte Faltung von **T** mittels CD-Spektroskopie überprüft und die simultane Bindung beider Peptide validiert wurde, konnten die Affinitäten der modifizierten Peptide **A** und **B** zu **T** mittels Fluoreszenzpolarisationsmessung bestimmt werden. Anschließend wurde

B mit elektrophilen Modifikationen versehen (**B1** – **B5**) und in einem initialen unvermittelten Reaktionstest mit einem Überschuss von **GSH** als Nukleophil zur Reaktion gebracht (Abbildung 59).

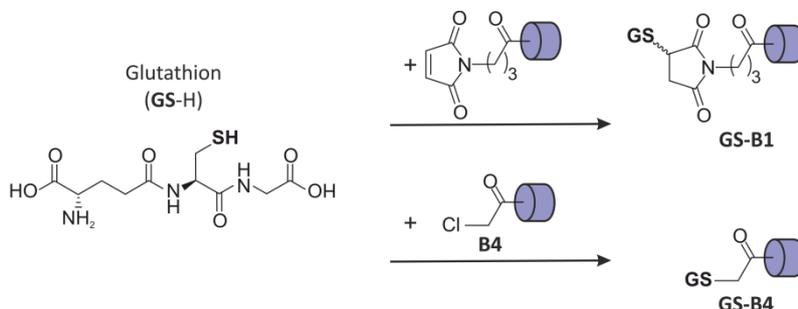


Abbildung 59: Reaktionsschema der zwei elektrophilen Peptidvarianten **B1** und **B4** mit **GSH**.

Basierend auf den Produktausbeuten und den mittels HPLC berechneten relativen Anfangsgeschwindigkeiten ($v_{rel.}$) wurden das Maleimid-Derivat **B1** und das Chloracetamid-Derivat **B4** mit Anfangsgeschwindigkeiten von $v_{rel.} > 7 \cdot 10^2$ (**B1**) bzw. $v_{rel.} = 1$ (**B4**) als die aussichtsvollsten Elektrophile zur Templat-vermittelten Verknüpfung ausgewählt (Abbildung 59). Im weiteren Verlauf wurde der Effekt von **T** in einer Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktion von **B1** bzw. **B4** zusammen mit dem Cystein-modifizierten Peptid-Derivat **A1** bei verschiedenen pH-Werten untersucht (Abbildung 60).

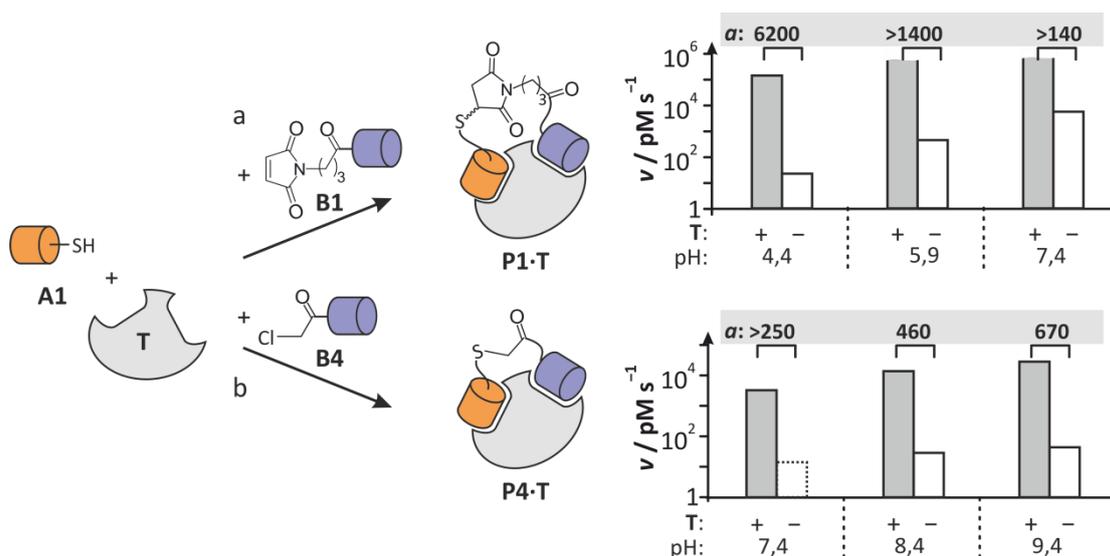


Abbildung 60: Links: Prinzip der Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktion zwischen **A1** und a) dem Maleimid-Derivat **B1** und b) dem Chloracetamid-Derivat **B4** in Gegenwart zum Produktkomplex **P1-T** bzw. **P4-T**. Rechts: Die Beschleunigungsrate α der jeweiligen Reaktion in Abhängigkeit der gewählten pH-Werte.

Die Resultate zeigten einen deutlichen Einfluss des pH-Werts auf beide Reaktionen. Auf diese Weise konnte durch die Verwendung von **T** eine Reaktionsbeschleunigung von $\alpha = 6200$ für **B1** und $\alpha = 670$ für **B4** im Vergleich zur unvermittelten Reaktion erzielt werden. Die Beschleunigungsrate für **B1** überstieg dabei sämtliche bis dato beschriebenen Beschleunigungsraten Templat-vermittelter Reaktionen.^[10-12]

Final wurde das Potential der Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktion zur selektiven Markierung eines Zielproteins (**HSP**) in Zelllysate untersucht, indem vier Varianten von mit **A** fusionierten **HSP** erstellt wurden (c **A-HSP**, a **A-HSP**, **HSP-cA** und **HSP-aA**, Abbildung 61). Während beide nukleophil modifizierten **HSP**-Varianten eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit aufwiesen, konnte für keine der Alaninmutanten sowie für die Reaktionen in Abwesenheit von Templat ein Fluoreszenzsignal beobachtet werden.

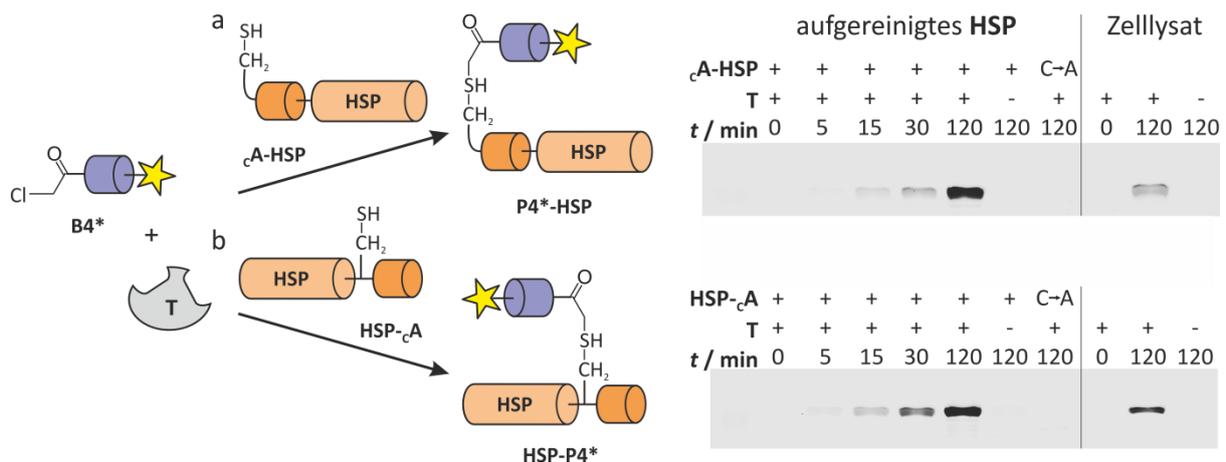


Abbildung 61: a) N-terminale Markierungsreaktion von c **A-HSP**. b) C-terminale Markierungsreaktion von **HSP-cA**.

Im zweiten Teil Arbeit wurde, basierend auf dem zuvor etablierten trimären Modellsystem, die Transferreaktion einer Reportergruppe **F** von einem Donor- **D** auf einen Akzeptorliganden **A** realisiert (Abbildung 62). Auf diese Weise sollte die Produktinhibierung von **T**, die aus der Affinitätszunahme des Verknüpfungsprodukts resultierte, vermieden und die Austauschrate der Produkt- und Eduktliganden erhöht werden. Hierbei wurde das Prinzip der nativen chemischen Ligation verwendet. Zur Bestimmung der Transfereffizienz wurde der Akzeptor C-terminal mit einem Quenschermolekül (**Q**) modifiziert. Durch den Transfer

von **F** auf **A** konnte die Transfereffizienz mittels Fluoreszenzlöschung in Echtzeit verfolgt und ausgewertet werden.

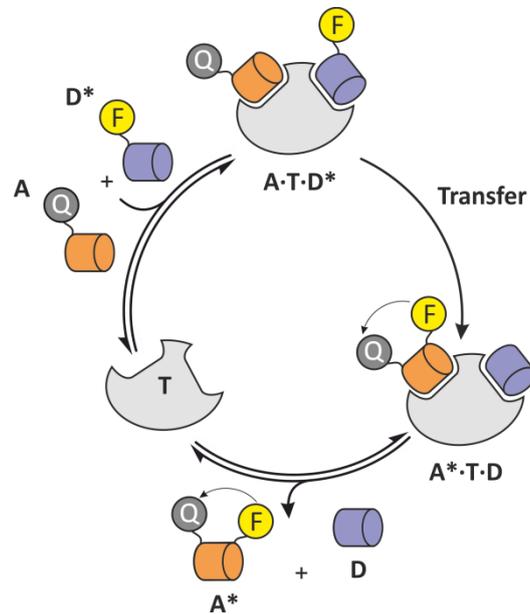


Abbildung 62: Prinzip der Templat-vermittelten Transferreaktion; **A** = Akzeptorligand (**A5** bzw. **A6**, orange), **D*** = Donorligand mit **F** = Reportergruppe (gelb), **T** = Templat (hellgrau), **Q** = Quencher, * = Reportergruppe(**F**)-tragende Peptidsequenz.

Zunächst erfolgte eine Sequenzoptimierung der Donor- und Akzeptorliganden. Dabei konnten innerhalb der Donorliganden **D*** drei potentiell nukleophile Reste durch inerte Alaninreste substituiert werden, ohne deutlich an Affinität zum Proteintemplat **T** zu verlieren. Die Akzeptorsequenzen wurden um maximal zwei Aminosäuren *N*- und *C*-terminal verkürzt. Auch hierfür blieben die Affinitäten zu **T** nahezu unverändert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Reaktionsausbeuten (η) sowie der resultierenden Wechselzahlen (*WZ*) zur Ermittlung des katalytischen Potentials von **T** unter Verwendung der längsten und der kürzesten erstellten Akzeptorliganden **A5** bzw. **A6** (Abbildung 63).

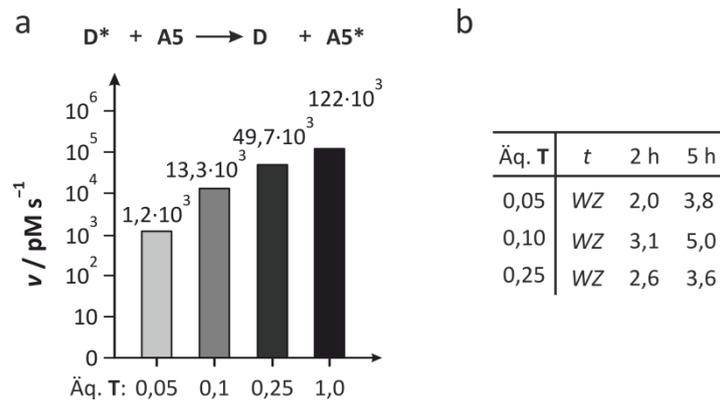


Abbildung 63: a) Anfangsgeschwindigkeiten v der Templat-vermittelten Transferreaktion zwischen D^* und $A5$ in Gegenwart von 0,05 Äq., 0,1 Äq., 0,25 Äq. und 1 Äq. T . b) Ausgewählte Wechselzahlen WZ nach $t = 2$ h und $t = 5$ h Reaktion in Gegenwart substöchiometrischer Mengen T für die Reaktion von D^* und $A5$.

Für beide Akzeptorliganden $A5$ und $A6$ konnten Wechselzahlen generiert werden, die ein katalytisches Transferverhalten von T bestätigten. Der N -terminal verkürzte Peptidligand $A6$ wies dabei eine geringfügig langsamere Transferreaktion auf, als Ligand $A5$ mit langem N -Terminus. Final wurde das Potential des Transfersystems zur Markierung eines Zielproteins mit der Reportergruppe F^* überprüft. Diesbezüglich erfolgte die N -terminale Fusion einer auf $A6$ -basierten Sequenz an das Zielprotein Luc (Abbildung 64). Die Auswertung mittels Fluoreszenzlesegerät ergab eine deutliche zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität, was die Modifikation des Zielproteins Luc mit F anzeigt. Somit konnte auch für die Transferreaktion eine zeitabhängige Markierung von Zielprotein nachgewiesen werden.

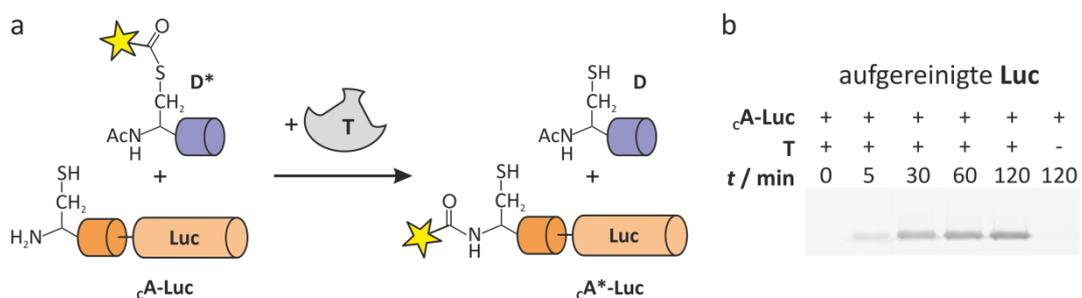


Abbildung 64: a) Prinzip der Templat-vermittelten Markierung von ϵ -A-Luc durch Transferreaktion zwischen ϵ -A und D^* . b) Fluoreszenzbild der Markierungsreaktion von ϵ -A-Luc durch Templat-vermittelten Transfer der Reportergruppe F ; * = F -modifiziertes Molekül.

4.2 Ausblick

Zukünftig sollten weitere Verkürzungen innerhalb der Akzeptorsequenz unternommen werden, um einen Minimalliganden zu erstellen. Dieser könnte generelle Informationen über Flexibilität und die Abstandsverhältnisse der am Modellsystem beteiligten Peptidliganden liefern. Zudem würde ein verkürzter Akzeptorligand innerhalb von Markierungsreaktionen den Erhalt bioaktiver Funktionalität des Zielproteins begünstigen. Weiterhin sollte die Templat-vermittelte Markierung von Zielproteinen mittels Transferreaktion innerhalb von Zellysate untersucht werden, um den Anwendungsbereich zu erweitern und ggf. langfristig eine neue Methode zur selektiven Markierung von Zielproteinen zu etablieren.

Aus den in dieser Arbeit erlangten Resultaten geht hervor, dass besonders für den langen Akzeptorliganden **A5** der Umsatz für längere Messzeiträume gesteigert werden könnte. Um eine maximal mögliche Wechselzahl *WZ* innerhalb der Transferreaktion zu bestimmen, sollten daher Messungen mit längeren Inkubationszeiten durchgeführt werden. Zudem sollte untersucht werden, inwieweit eine Konzentrationserhöhung beider Edukte eine Beschleunigung der Transferreaktion bewirkt.

Weiterhin sollte eine Beschleunigung der Austauschrate von Edukt- und Produktliganden am Proteintemplat angestrebt werden. Bestünde die Möglichkeit, die Affinität des Produktliganden durch eine dem Transfer nachfolgende Reaktion zu verringern, könnte die Ligandeninhibierung minimiert werden. Ein potentieller Ansatz könnte aus dem Konzept photoaktivierbarer Moleküle gewonnen werden.^[281] Hierbei durchlaufen Verbindungen wie z. B. Azobenol-Derivate durch Photoaktivierung eine Konformationsänderung,^[282-283] was in dem hier verwendeten Modell eine signifikante Senkung der Bindungsaffinitäten bewirken könnte. In dem hiesigen Modell müsste die Konformationsänderung jedoch von dem Produktliganden eigenständig und nicht manuell initiiert erfolgen. Zudem müssten ausschließlich die Produktliganden diese Konformations-ändernde Funktion enthalten, um keine Affinitätsverschlechterung der Eduktliganden zu erwirken. Ein weiteres Konzept könnte eine Reaktion der Produktliganden darstellen, die in eine Änderung der Produktsequenz und somit in der Affinitätsabnahme zum Templat resultiert.

5 Material und Methoden

5.1 Vektoren, Mikroorganismen und Enzyme

5.1.1 Verwendete Ausgangsvektoren

Tabelle 2: Verwendete Ausgangsvektoren. Die zugehörigen Vektorkarten sind in Kapitel 9.5 dargestellt; lacI = Lac-Repressorgen, AmpR = Gen zur Ampicillinresistenz, KanR = Gen zur Kanamycinresistenz, n-GST = N-terminales GST-Gen, n-THB-CS = N-terminale Thrombinerkennungssequenz, n-His = Gen für einen N-terminalen Polyhistidin-Tag, MSC = *multiple cloning site*, HSP70 = Hitzeschockprotein70, Luc2 = Firefly Luciferase.

Vektor	Größe	Eigenschaften	Firma
pGEX-4T-1	4969 bp	lacI, AmpR, n-GST, n-THB-CS, MSC	GE Healthcare
pET-28a(+)	5369 bp	lacI, KanR, n-His, n-THB-CS, n-T7, MSC, c-His	Novagen
pCMV6-XL5[<i>hsp70</i>]	6361 bp	Kodiert für das HSP70 1A (HSPA1A) aus <i>Homo sapiens</i> , AmpR	OriGene
pGL4.10[<i>luc2</i>]	6016 bp	Kodiert für die Firefly Luciferase Luc2 aus <i>Photinus pyralis</i> , AmpR	Promega

5.1.2 Mikroorganismen

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Firma
One Shot®	T1 ^R = T1 Phage-Resistent, F' (<i>proAB+ lacI^q lacZΔM15 Tn10(Tet^R)</i>)	Invitrogen™
OmniMAX™ 2 T1 ^R	Δ(<i>ccdAB</i>)/ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80(<i>lacZ</i>) ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD</i>	
BL21-Gold(DE3)	F' <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ TetR <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	Agilent Technologies

5.1.3 Proteasen

Tabelle 4: Verwendete Proteasen und Erkennungssequenzen. Die TEV-Erkennungssequenz wurde innerhalb dieser Arbeit modifiziert, sodass nach dem Verdau mit TEV-Protease wahlweise ein N-terminales Gly, Cys oder Ala am Zielprotein generiert wurde. Die jeweils verwendete Aminosäure ist in den entsprechenden Passagen explizit angegeben.

Protease	Erkennungssequenz ^[280]	Eingesetzte Proteasemenge
TEV ^[284]	ENLYFQ/G	0,05 mg pro mg Fusionsprotein
	ENLYFQ/C	0,05 mg pro mg Fusionsprotein
	ENLYFQ/A	0,05 mg pro mg Fusionsprotein

5.1.4 Enzyme

Tabelle 5: Eingesetzte Polymerasen, DNAsen und RNAsen. Die Einheit U (*unit*) entspricht der Menge an Enzym, die eine Transformation von 1 μmol Substrat pro min unter definierten Bedingungen katalysiert.^[285]

Enzym	Verwendung	Herkunft
Pfu DNA Polymerase (native), $2,5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Ortsgerichtete Mutagenese	Thermo Scientific
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase, $2,5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Bereits im Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix enthalten (Kapitel 5.2)	Finnzymes
DNaseI	Restriktion und Abbau der DNA bei der Zelllyse	Applichem
SAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>), $1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Dephosphorylierung von verdauten Vektoren	USB®
T4 DNA Ligase, $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Ligation von Zielgen und Vektor	Fermentas
RNase	Isolierung von Plasmid-DNA	Applichem
Lysozym	Zellwandvorverdau beim Zellaufschluss	Applichem

5.1.5 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 6: Verwendete Restriktionsendonukleasen.^[286] Hierbei handelt es sich ausschließlich um FastDigest®-Varianten der Firma Fermentas.

Endonuklease	Erkennungssequenz	Charakteristika	Einheiten
<i>NcoI</i>	c/catgg	5'-catg-Überhang	$1 \text{ FDU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
<i>NdeI</i>	ca/tatg	5'-ta-Überhang	$1 \text{ FDU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
<i>XhoI</i>	c/tcgag	5'-tcga-Überhang	$1 \text{ FDU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
<i>DpnI</i>	ga ^{Me} /tc	dam-methylierte DNA	$1 \text{ FDU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

5.2 Stammlösungen, Nährmedien und Additive

5.2.1 Stammlösungen für die Molekularbiologie

Tabelle 7: Innerhalb der Molekularbiologie verwendete Stammlösungen.

Produkt	Verdünnung	Verwendung	Herkunft
2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix, $2,5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	1 : 2	PCR Amplifikation von Zielsequenz	Finnzymes
10x Pfu Polymerase Puffer + MgSO_4	1 : 10	Ortsgerichtete Punktmutagenese	Fermentas
10x Shrimp Alkaline Phosphatase RX-Puffer	1 : 10	Dephosphorylierung von verdauten Vektoren	USB®
10x T4 DNA Ligase Puffer	1 : 10	Ligation von Zielgen und Vektor	Fermentas
10x Fast Digest® Buffer	1 : 10	DNA-Restriktion mittels FastDigest®-Endonukleasen	Fermentas
10.000x GelRED™	1 : 10.000	Markierung der DNA bei der Agarosegel-Elektrophorese	VWR
Nucleic Acid Gel Stain			
6x Loading Dye Solution	1 : 6	DNA-Ladepuffer bei der Agarosegel-Elektrophorese	Fermentas
Bradford-Reagent, ready-to-use	-	Zur Identifizierung von proteinhaltigen Fraktionen innerhalb der Proteinaufreinigung	Fermentas

5.2.2 Referenzmarker

Tabelle 8: Verwendete Referenzmarker.

Produkt	Verwendung	Firma
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus	Referenzmarker bei der Agarosegel-Elektrophorese	Fermentas
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Referenzmarker bei der SDS-PAGE	Fermentas

5.2.3 Stammlösungen für Agarosegel-Elektrophorese

Tabelle 9: Für die Agarosegel-Elektrophorese erstellte Stammlösungen.

50x TAE-Pufferstammlösung	0,5 M EDTA-Stammlösung
242 g Tris	146,12 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
57,1 mL AcOH	Auf 1 L mit ddH ₂ O auffüllen
100 mL EDTA (0,5 M)	Agarosegel, 1 %
Auf 1 L mit ddH ₂ O auffüllen und mit KOH auf pH 8,5 einstellen.	5 g Agarose in 1 L 1x TAE-Puffer und 5 µL (0,00001 % (v/v) GelRed™ Nucleic Acid Stain in einer Mikrowelle lösen, bis Lösung klar und frei von Schlieren ist.

5.2.4 Stammlösungen für SDS-PAGE

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen für die SDS-PAGE. Die Gelkompositionen beziehen sich auf die Herstellung von einem SDS-Gel mit 1 mm Dicke, d. h. 5 mL Trenngel und 1 mL Sammelgel.

4x SDS-Probenladepuffer		SDS-Laufpuffer	
0,2 M	Tris, pH 6,8	25 mM	Tris
8 % (w/v)	SDS	0,2 M	Glycin
40 % (w/v)	Glycerol	0,1 % (w/v)	SDS
0,08 % (w/v)	Bromphenolblau		
4 % (588 mM)	BME		

Färbelösung		Entfärbelösung	
0,6 g	Coomassie Brilliant Blue G 250	200 ml	EtOH
400 mL	EtOH	200 mL	AcOH
100 mL	AcOH	700 mL	ddH ₂ O
400 mL	ddH ₂ O		

Trenngel, 12 %		Trenngel, 15 %		Sammelgel, 5 %	
1,6 mL	1,1 mL	ddH ₂ O	680 µL	ddH ₂ O	
2,0 mL	2,5 mL	30 % Acrylamid-Mix	170 µL	30 % Acrylamid-Mix	
1,3 mL	1,3 mL	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8, 0,4 % SDS w/v)	130 µL	1 M Tris (pH 6,8, 0,4 % SDS w/v)	
50 µL	50 µL	10 % SDS	10 µL	10 % SDS	
50 µL	50 µL	10 % APS	10 µL	10 % APS	
2 µL	2 µL	TEMED	1 µL	TEMED	

5.2.5 Stammlösungen für den Western Blot und den ELISA

Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen für den Western Blot und den ELISA.

Transepuffer (Towbin-Buffer)		TBS-Puffer	
25 mM	Tris, pH 8,3	50 mM	Tris-HCl, pH 7,8
192 mM	Glycin	150 mM	NaCl
20 % (w/v)	Methanol	1 mM	MgCl ₂
pH-Wert überprüfen, nicht einstellen		TBS-T-Puffer	TBS + 0,2 % Tween20

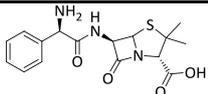
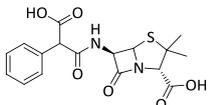
5.2.6 Nährmedien

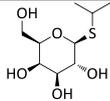
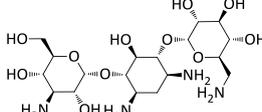
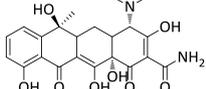
Tabelle 12: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien.

LB-Medium		TB-Medium Komponente1	
10 g	Bakt. Trypton	12 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt	24 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl	4 mL	Glycerol
Auf 1 L mit ddH ₂ O auffüllen und autoklavieren, pH 7,4.		Auf 1 L mit ddH ₂ O auffüllen und autoklavieren.	
SOC-Medium		TB-Medium Komponente2	
20 g	Trypton	2,31 g	KH ₂ PO ₄ (0,17 M)
5 g	Hefeextrakt	12,54 g	K ₂ HPO ₄ (0,72 M)
10 mM	NaCl	Auf 100 mL mit ddH ₂ O auffüllen.	
2,5 mM	KCl	Nach dem Autoklavieren werden die Komponenten 1 und 2 vereint.	
10 mM	MgCl ₂		
10 mM	MgSO ₄		
20 mM	Glucose		
Auf 1 L mit ddH ₂ O auffüllen und autoklavieren.			

5.2.7 Medienadditive

Tabelle 13: Verwendete Medienadditive. Zur Herstellung aller Stammlösungen wurde ddH₂O als Lösungsmittel verwendet. Sämtliche Lösungen wurden steril-filtrierte und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. AgPI = Agarplatte.

Substanz	Struktur	Verwendete Konzentration	Stammlösung	Herkunft
Ampicillin (Amp)		100 µg·mL ⁻¹ in LB-AgPI	Pulver	MPI Medienküche
Carbenicillin (Crb)		100 µg·mL ⁻¹ in Medien 50 µg·mL ⁻¹ in LB-AgPI	50 mg·mL ⁻¹	Biomol

Substanz	Struktur	Verwendete Konzentration	Stammlösung	Herkunft
IPTG		0,5 mM	1 M	Sigma
Kanamycin (Kan)		50 µg·mL ⁻¹ in LB-Medium 100 µg·mL ⁻¹ in TB-Medium 50 µg·mL ⁻¹ in LB-AgPl	100 mg·mL ⁻¹	Gerbu
Tetracyclin (Tet)		25 µg·mL ⁻¹ in LB-AgPl	Pulver	MPI Medienküche

5.3 Analytische Methoden

5.3.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine elektrophoretische Methode mit der sich Nukleinsäuren ihrer Masse nach auftrennen und analysieren lassen.^[287] Innerhalb dieser Arbeit wurden ausschließlich Agarosegele mit einem Anteil von 1 % Agarose verwendet. Die zu testenden DNA-Proben wurden zu Beginn in einem Verhältnis von 1:6 mit 6-fach-Ladepuffer (6x Loading Dye Solution) vermischt. Anschließend wurden die Proben auf das Agarosegel aufgetragen. Als Referenz wurden 6 µL des Referenzmarkers (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus) in eine separate Geltasche aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V bis die Proben hinreichend aufgetrennt waren. Für eine schnelle Überprüfung des Gels wurde ein high performance UV Transilluminator der Firma UVP verwendet. Eine ausführliche Analyse und Dokumentation der Gele erfolgte mittels Alphamager® Gel Dokumentationssystem (FluorChem™) der Firma Alpha Innotech.

5.3.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine elektrophoretische Methode mittels der sich Proteinmischungen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses auftrennen lassen.^[288-290] Allgemein wurde die aufzutragende Probe auf die ursprüngliche 'native Zellkulturkonzentration' mittels 1x SDS-Laufpuffer zurück verdünnt. Anschließend wurde jede Probe für die Verwendung einer SDS-PAGE präpariert (Tabelle 14). Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 99 °C denaturiert. Innerhalb der Proteinaufreinigungen wurden stets 12 µL Probe auf das SDS-Gel aufgetragen. Im Falle von

konzentriertem Zielprotein wurden konzentrationsabhängige Mengen (4 – 8 μL) aufgetragen. Als unabhängiger Standard wurden 6 μL Referenzmarker (Kapitel 5.2.2) in einer separaten Tasche eines jeden Gels aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 40 mA pro in der Kammer befindliches SDS-Gel. Final wurden die auf dem Gel befindlichen Proteine mittels Färbelösung kenntlich gemacht und überschüssige Gelfärbung mittels Entfärbelösung entfernt (Kapitel 5.2.4). Beide Schritte wurden unter dem Einsatz einer Mikrowelle beschleunigt. Das entfärbte Gel wurde mit einem Scanner (Epson Perfection 2400 Photo) der Firma Epson dokumentiert.

Tabelle 14: Herstellung von Proben für die SDS-PAGE; VA = Volumenanteil, LP = 1x SDS-Laufpuffer, PP = 4x SDS-Probenladepuffer.

Probeninhalt	Probenpräparation
Ganze Zellen vor der Zelllyse	1 VA Probe + 1 VA 1xLP + 1 VA 4x PP
Zellüberstand	3 VA Probe + 1 VA 4x PP
Proben aus der Proteinaufreinigung	4 VA Probe + 1 VA 4x PP

5.3.3 Western Blot

Der Western Blot (*immunoblot*) ist eine Methode zur elektrophoretischen Übertragung aufgetrennter Proteinproben auf eine Trägermembran.^[291-293] Die Protein-haltige Membran kann dabei im weiteren Verlauf mittels spezifischer Markierungsreaktionen, wie z. B. via Antikörper analysiert und ausgewertet werden. In dieser Arbeit wurde eine Nitrocellulosemembran (BA85, 0,45 μM , 200mm x 3 m) der Firma Protran als Trägermembran eingesetzt. Die Zusammensetzungen der hier verwendeten Puffer sind dem Kapitel 5.2.5 zu entnehmen.

Zunächst wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden das SDS-Gel und die Nitrocellulosemembran für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den elektrophoretischen Transfer der Probenbanden auf die Membran wurden 2 – 3 Lagen Whatmanpapier kurz in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf das Kammer-system gelegt. Darauf wurde anschließend die Nitrocellulose-Membran gefolgt von dem SDS-Gel gestapelt. Final wurden erneut 2 – 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier aufgelegt. Der Transfer erfolgte nach dem Semidry-Blotverfahren in einer Transferkammer (Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell) der Firma BIO-RAD für ca. 20 min bei 240 mA.

Anschließend wurde die Proben-haltige Membran mittels PoceauS angefärbt. Dieser Farbstoff bindet reversibel an protonierte Aminogruppen, wodurch eine initiale Überprüfung auf erfolgreichen Proteintransfer möglich ist. Die gefärbte Membran wurde dokumentieren und anschließend mittels ddH₂O entfärbt. Anschließend wurde eine Immunodetektion mittels ELISA durchgeführt.

5.3.4 ELISA

Die Immunodetektion mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist eine biochemische Methode zum Nachweis von Substanzen mittels Antikörper und Enzym-basierter Farbreaktion.^[294-295]

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Immunodetektion wurde die Membran für 1 h bei RT in 5 % Milchpulver in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) geblockt und anschließend 2x mit TBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Auftragung des primären His-Antikörpers *Penta-His-Antibody* der Firma Qiagen. Zu diesem Zweck wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 10 mL Antikörperlösung (1:2000 verdünnter Antikörper in TBS mit einer Spatelspitze Rinderserumalbumin (BSA)) inkubiert. Am Nächsten Tag wurde die Membran 2x mit Tween-haltigem TBS-Puffer (TBS-T) und 2x mit TBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Markierung mittels alkalischer Phosphatase (AP, welche an Anti-mouse IgG-Antikörper geknüpft ist) der Firma Cell Signaling. Dafür wurde die Membran für 4 h bei RT in 10 mL AP-Lösung (1:2000 verdünnte AP in TBS mit einer Spatelspitze BSA) inkubiert und anschließend 2x mit TBS-T und 2x mit TBS-Puffer gewaschen. Die finale Farbreaktion erfolgte mithilfe von BCIP und NBT (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz/Nitroblau-tetrazoliumchlorid) als AP-Nachweis. Dafür wurden ca. 3 mL BCIP/NBT-Lösung der Firma Calbiochem auf die Membran gegeben und solange unter Lichtausschluss inkubiert (einige Minuten) bis entsprechende Proteinbanden sichtbar wurden. Nachdem die Reaktion mit ddH₂O gestoppt wurde, konnte die Membran getrocknet und dokumentiert werden.

5.3.5 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie (Circulardichroismus-Spektroskopie) ist eine biophysikalische Methode mittels der sich die Sekundärstrukturanteile chiraler und somit optisch aktiver Verbindungen (hier Proteine) unter Verwendung von zirkular polarisiertem Licht bestimmen lassen.^[296-297] In dieser Arbeit wurde dafür ein Spektropolarimeter (J-715) der Firma Jasco verwendet. Das Proteintemplat **T** (50 μM) wurde zunächst in Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,5) verdünnt. Anschließend wurden je fünf CD-Spektren ($\lambda = 190 - 260 \text{ nm}$) aufgenommen. Für die Messung wurden folgende Parameter verwendet: kontinuierlicher Scannmodus, Sensitivität 10 mdeg, Auflösung 1 nm, Resonanz 1 s, Bandbreite 1,0 nm, Scangeschwindigkeit $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$. Die ermittelten Werte wurden mit dem FFT-Filter (*fast fourier transform*) geglättet. Die erhaltenen Daten werden als molare Elliptizität $[\theta_{\text{M}}]_{\lambda}$ in $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ angegeben. Das Verhältnis der sekundären Strukturelemente wurde mit der Software CDNN^[298] (*circular dichroism spectra by neural networks*) ermittelt. Dabei wurde FIT-23 als Referenzspektren ausgewählt, um die sekundären Strukturanteile zu bestimmen.

5.3.6 Fluoreszenzpolarisation

Die Fluoreszenzpolarisation (FP) ist eine Biophysikalische Methode mit der sich die Affinitäten von Fluorophor-markierten Verbindungen (Liganden) zu einem Zielprotein unter Einsatz von linearpolarisiertem Licht bestimmen lassen.^[299-301] In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mikrotiterplattenlesegerät (Safire² plate reader) der Firma Tecan mit einer eingestellten Extinktionswellenlänge λ_{ex} von 485 nm und einer Emissionswellenlänge λ_{em} von 525 nm verwendet. Zunächst wurden mit FITC markierte Peptide mit DMSO auf einen 0,5 mM-Lagerstock eingestellt. Dieser wurde anschließend verwendet um mittels FP-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,01 % Tween-20, pH 7,5) eine frische Peptidlösung von 90 nM zu erstellen. Acetylierte Peptide wurden hingegen auf eine Konzentration von 10 mM mit DMSO eingestellt um daraus anschließend eine frische 200 μM Peptidlösung mit FP-Puffer zu generieren.

Für eine Messreihe wurden in einer 384er Mikrotiterplatte (black, flat bottom 384-well-plate) der Firma Corning je 14 μL Proteintemplat pro Kavität vorgelegt und mit FP-Puffer in einer Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von drei verdünnt. Anschließend

wurden 4 μL Peptidlösung hinzugegeben, wodurch sich finale Konzentrationen von 20 nM FITC-markierter Peptide und ggf. 10 μM acetylierter Peptide in 18 μL Reaktionsvolumen ergaben. Die finalen Konzentrationen des Proteins reichten von maximal 120 μM bis 0,7 nM. Eine Messung erfolgte nach 5 min und eine zweite nach 1 h Inkubation bei RT. Vor jeder Messung wurde die Mikrotiterplatte in einer Zentrifuge (Centrifuge 5804 R) der Firma Eppendorf für 1 min bei 1000 rcf zentrifugiert um eventuelle bei dem Pipettiervorgang entstandene Blasen oder bei der Inkubation entstandene Verdunstungströpfchen zu entfernen und eine plane Messoberfläche zu schaffen. Sämtliche Proben wurden in Triplikaten vermessen. Der Fehler bezieht sich auf die Standardabweichung 1σ . Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) erfolgte mittels nicht-linearer Regressionsanalyse einer Dosis-Wirkungskurve. Die Auswertung wurde mithilfe der Auswertungssoftware Prism der Firma GraphPad durchgeführt.

5.3.7 MALDI-TOF-MS

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) mit gekoppeltem Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS, *Time-of-Flight mass spectrometer*) ist eine analytische Methode zur schnellen Bestimmung und Identifizierung von Verbindungen anhand ihrer molekularen Masse.^[287] In dieser Arbeit wurde ein Massenspektrometer (Voyager-DE™ Pro BioSpectrometry™ Workstation) der Firma Applied Biosystem verwendet.

Als organische Matrixsubstanz wurde eine gesättigte Lösung bestehend aus 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Sinapinsäure in ddH_2O mit 40 % ACN und 0,1 % TFA hergestellt. Die zu vermessende Probe wurde zunächst in ddH_2O mit 50 % ACN gelöst. Anschließend wurden für jede Probe drei Messpunkte mit je 0,5 μL Matrix auf der Platte vorgelegt. Schließlich wurden 0,5 μL einer Probe in drei Verdünnungsschritten zu den drei vorgelegten Matrices pipettiert, sodass final drei Messfelder pro Probe vorhanden waren. Die Intensität des Laserstrahls wurde individuell der zu vermessenden Probe angepasst, um ein optimales Signal-zu-Rauschverhältnis zu erhalten.

5.3.8 HPLC-MS

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit gekoppeltem Massenspektrometer (MS) ist eine analytische Methode zur Auftrennung und Identifizierung von Probemolekülen. Mit Ausnahme der hochaufgelösten Massenspektrometrie enthalten alle Gradienten einen Vorlauf entsprechender Anfangskonzentration an B für 3 min sowie einen finalen Waschschrift mit 95 % B für 5 min. Bei der Angabe der Gradienten entspricht A dem Anteil von Wasser (ddH₂O) und B dem Anteil an ACN im verwendeten Laufmittel. Zudem wurden beiden Laufmitteln (A und B) je 0,1 % TFA zugefügt um eine quantitative Ionisierung der Analytmoleküle zu gewährleisten. Im Falle der hochaufgelösten Massenspektrometrie wurde 0,1 % Ameisensäure anstelle von TFA verwendet.

Analytische HPLC-ESI-MS

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine analytische HPLC-Anlage (1260 Infinity) mit ESI (Elektronenspray Ionisation)-Massenspektrometrie-Kopplung^[302-303] (MS, 6120 Quadrupole) der Firma Agilent Technologies zur Analyse und Validierung von Probeninhalten verwendet. Als Säule wurde eine Zorbax Eclipse XDB-C18 *reverse-phase column* (4,6 x 150 mm, Partikelgröße 5 µm) der Firma Agilent eingesetzt. Zu Beginn wurden die zu vermessenden Proben stets in ddH₂O mit 20 % bis 30 % ACN gelöst und gefiltert. Die verwendeten Gradienten sahen wie folgt aus:

- Gradient 5: 02 % B auf 70 % B in 20 min
- Gradient 6: 02 % B auf 70 % B in 10 min
- Gradient 7: 30 % B auf 70 % B in 20 min
- Gradient 8: 05 % B auf 95 % B in 10 min
- Gradient 9: 25 % B auf 70 % B in 20 min
- Gradient 10: 25 % B auf 70 % B in 10 min

Hochaufgelöste MS

Zur näheren und eindeutigen Identifizierung von Peptiden und Bausteinen wurden diese mithilfe von hochaufgelöster MS vermessen und analysiert. Mit Ausnahme der Reportergruppe **F**, welche mit einer Konzentration von 1 mg·mL⁻¹ in 100 % Methanol

(MeOH) gelöst wurde, wurden sämtliche anderen Proben mit gleicher Konzentration in 50 % ACN gelöst. Anschließend wurden die Proben als 100 μL -Aliquot an der Technischen Universität Dortmund vermessen. Als Analysesystem wurde eine LTQ Orbitrap mit gekoppeltem HPLC-System (Accela) der Firma Thermo Electron eingesetzt. Dabei wurden 5 μL einer Probe mittels Gradient 11 und einer Flussrate von 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ verwendet.

- Gradient 11: 50 % B (isokratisch)

Semi-präparative HPLC

Zur Aufreinigung und Isolierung von Peptiden und anderer Verbindungen wurde eine semi-präparative HPLC der Firma Shimadzu verwendet (Tabelle 15).

Tabelle 15: Module der semi-präparativen HPLC.

Modul	Typisierung
Probengeber	SIL-10AP
Prep LC	LC-8A
UV/VIS Detektor	SPD-20AV
Fraktionssammler	FRC-10A
System Controller	CBM-20A

Für kleine präparative Ansätze ($\leq 10 \mu\text{mol}$) wurde eine 50 mm lange Vorsäule (VP50/10 Nucleodor, C18 Gravity, 5 μm) der Firma Macherey-Nagel und eine 125 mm lange Hauptsäule (VP125/10 Nucleodor, C18 Gravity, 5 μm) der Firma Macherey-Nagel mit einem jeweiligen Säuleninnendurchmesser von 10 mm und einer Flussrate von 6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ eingesetzt. Für große präparative Ansätze ($> 10 \mu\text{mol}$) wurde eine 50 mm lange Vorsäule (VP50/21 Nucleodor, C18 Gravity, 5 μm) der Firma Macherey-Nagel und eine 125 mm lange Hauptsäule (VP125/21 Nucleodor, C18 Gravity, 5 μm) der Firma Macherey-Nagel mit einem jeweiligen Säuleninnendurchmesser von 21 mm und einer Flussrate von 17,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ verwendet. Die Gradienten sind im Folgenden beschrieben:

- Gradient 12: 10 % B auf 70 % B in 40 min (für sämtliche Peptidvarianten)
- Gradient 13: 02 % B auf 70 % B in 40 min (für die Reportergruppe **F**)

Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Peptidlösungen mithilfe von Gefriertrocknung an einem Lyophilisator (Hete PowerDry® LL1500 Freeze Dryer) der Firma Thermo Electron

Corporation vom Lösungsmittel befreit und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.3.9 Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung des Schmelzpunkts chemischer Stoffe ist eine historisch etablierte Methode für dessen Charakterisierung und Reinheitsbestimmung. Dabei ist ein präziser und konstanter Schmelzpunkt charakteristisch für eine chemisch reine Substanz.^[304] Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Schmelzpunktgerät (Melting Point B-540) der Firma Büchi eingesetzt.

Zu Beginn wurde die trockene Probe in eine Schmelzpunktkapillare gefüllt. Anschließend wurde die Kapillare durch ein ca. 1 m langes Glasrohr auf den Tisch fallen gelassen um die Probesubstanz am Kapillarboden möglichst dicht zu packen. Dies wurde solange wiederholt, bis die Probe eine ca. 1 cm hohe Säule in der Kapillare bildete. Da bei den hier erstellten Verbindungen keine Angaben über deren Schmelzpunkte bekannt waren, wurde zunächst ein Schnelltest zur initialen Abschätzung des Schmelzbereichs durchgeführt. Dafür wurde die Heizrate des Geräts auf $5\text{ }^{\circ}\text{C pro min}$ eingestellt. Die Starttemperatur betrug $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, die maximal eingestellte Temperatur betrug $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sobald der ungefähre Schmelzpunkt definiert werden konnte, erfolgte ein zweiter Durchgang mit frischer Probe. Hierbei wurde die Heizrate auf $0,5\text{ }^{\circ}\text{C pro min}$ verringert, um eine möglichst präzise Bestimmung gewährleisten zu können. Der Temperaturstartwert sowie das Temperaturmaximum innerhalb des eingestellten Intervalls betragen jeweils $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ Unterschied zum zuvor abgeschätzten Schmelzpunkt.

5.3.10 NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) ist eine spektroskopische Methode zur strukturellen Aufklärung von Molekülen.^[305] Dabei bedient sich diese analytische Methode der magnetischen Kernresonanz der Probenmoleküle. In dieser Arbeit wurden sämtliche ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit einem Varian Mercury-400 NMR-Spektrometer mit einem Oxford NMR 400- Magneten vermessen. Die Proben wurden in einer Konzentration von $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in deuteriertem DMSO (DMSO- d_6) gelöst und mit einer

Intensität von 400 MHz für ^1H -NMR-Spektren und 100 MHz für ^{13}C -NMR-Spektren vermessen. Zur Auswertung wurden die von Gottlieb *et al.* berichteten chemischen Verschiebungen als Kontrolle verwendet.^[306]

5.3.11 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie ist eine spektroskopische Analysemethode, in der Wellenlängen im ultravioletten (UV) bis sichtbaren (VIS, *visible*) Bereichs des elektromagnetischen Spektrums verwendet werden.^[287] In dieser Arbeit wurde diese Methode zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren sowie Peptiden und Proteinen eingesetzt.

Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentration von Plasmid-DNA erfolgte mittels UV/VIS-Spektrophotometer (NanoDrop 2000c) der Firma PEQLab Biotechnologie bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm. Das einzusetzende DNA-Probenvolumen betrug 1 μL .

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Detektion proteinhaltiger Fraktionen innerhalb der Proteinaufreinigung wurde ein Schnelltest nach Bradford^[307] mit dem Bradford-Reagenz der Firma Fermentas durchgeführt (Kapitel 5.2). Dafür wurden 5 μL einer Probe mit 80 μL Bradfordreagenz vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mittels Farbintensität beurteilt, welche Proben prinzipiell Protein enthielten.

Eine exakte Konzentrationsbestimmung von aufgereinigten Proteinlösungen erfolgte mit einem UV/VIS-Spektrophotometer (NanoDrop 2000c) der Firma PEQLab Biotechnologie bei einer Wellenlänge (λ) von 280 nm und unter Angabe der molekularen Masse (MW) und des individuellen Extinktionskoeffizienten (ϵ) des zu vermessenden Proteins. Diese Angaben wurden zuvor mithilfe des Internetprogramms ProtParam der Firma ExPASy bestimmt. Das einzusetzende Probenvolumen betrug 2 μL .

Konzentrationsbestimmung innerhalb der Peptidsynthese

In dieser Arbeit wurde eine UV/VIS-Spektrophotometer (V-550) der Firma Jasco verwendet. Mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Formel 1).

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Formel 1: Lambert-Beer'sches Gesetz; E = Extinktion, ε = dekadische Extinktionskoeffizient [$\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$], λ = verwendete Wellenlänge, c = Stoffmengenkonzentration [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] und d = Schichtdicke der Küvette [m].

Unter Berücksichtigung des für die Messung verwendeten Verdünnungsfaktors innerhalb der Küvette konnten so die genauen Konzentrationen der Probenlösungen berechnet werden. Alle Konzentrationsbestimmungen erfolgten in MeOH, mit Ausnahme von mit FITC modifizierten Verbindungen. In diesen Fällen wurde ein Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8,5) genutzt. Die Wellenlängen sowie Extinktionskoeffizienten wurden den UV/VIS-aktiven Verbindungen entsprechend verwendet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Parameter der verwendeten UV/VIS-aktiven Verbindungen.

Verbindung	Wellenlänge (λ) des Absorptionsmaximums	Extinktionskoeffizient ε
Fmoc Addukt	295 nm	$7.800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
FITC	494 nm	$77.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
DABCYL	430 nm	$3.200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Tyr	275 nm	$1.420 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Trp	280 nm	$5.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

5.3.12 Fluoreszenzbildgebung

Zum Nachweis selektiver Markierungsreaktionen von Zielproteinen wurde ein Fluoreszenzlesegerät eingesetzt.^[308] Zu diesem Zweck mussten die zu analysierenden Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen werden (Kapitel 5.3.2). Anschließend konnte das Gel mithilfe des Fluoreszenzlesegeräts analysiert werden. Innerhalb der Verknüpfungsreaktionen wurde dafür das FLA-5000 Imaging System der Firma Fujifilm eingesetzt. Für die Transferreaktionen wurde der Typhoon Trio+ Variable Mode Imager der Firma Amersham Biosciences verwendet. Die Geräteeinstellungen mussten stets individuell angepasst werden um ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten.

5.4 Gentechnische Methoden

Am Ende einer jeden Klonierung wurde stets eine Testrestriktion sowie eine Sequenzierung zur finalen Kontrolle des Zielkonstrukts durchgeführt (Kapitel 5.4.6 und 5.4.7). Eine Übersicht aller relevanten Sequenzierungsergebnisse ist in Kapitel 9.5 gegeben. Die in dieser Arbeit zur Klonierung oder Sequenzierung verwendeten Primer wurden zu Beginn, wie vom Hersteller angegeben, auf eine Konzentration von $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ mittels ddH₂O eingestellt und anschließend auf $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ verdünnt. Für alle Versuche, in denen Primer verwendet wurden, wurden ausschließlich die verdünnten Lösungen eingesetzt. Die Abschätzung der Schmelztemperaturen aller verwendeten Primer erfolgte mithilfe der frei verfügbaren Software DNAClub (entwickelt von Xiongfong Chen). Die zur Klonierung verwendeten gBlocks® wurden zu Beginn, wie vom Hersteller angegeben, in 20 μL Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert, um eine Lösung von $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ zu generieren. Für alle Durchführungen, in denen gBlocks® Verwendung fanden, wurden ausschließlich die verdünnten Lösungen eingesetzt.

Eine Übersicht der verwendeten Primer und gBlocks® ist in den Kapiteln 9.1 und 9.2 aufgeführt. Eine Darstellung sämtlicher Vektorkarten und relevanter Gensequenzen sind im Anhang den Kapiteln 9.3 und 9.5 zu entnehmen. Eine Übersicht der erstellten Vektorkonstrukte ist in der folgenden Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: In dieser Arbeit erstellte Vektorkonstrukte **K1** – **K7**. Die zugehörigen Vektorkarten finden sich in Kapitel 9.5. In **K7** wurde die TEV-Erkennungssequenz dahin gehend verändert, als dass durch das Schneiden mittels TEV-Protease ein N-terminales Cystein statt einem Glycin (im Wildtyp) am Zielprotein generiert wurde (TEV_{G→C}). Weiterhin wurde das im Vektor enthaltene N-terminale His₆-Tag durch ein GST-Tag substituiert. N-terminales Met = Met oder fMet (N-Formyl-Methionin).^[309-311]

Konstrukt Nr.	Größe	Ausgangsvektor	Verwendeter Affinitätstag	Generiertes Protein
K1	5617 bp	pET-28a(+)	N-terminal His ₆	KIX (Proteintemplat T)
K2	5239 bp	pGEX-4T-1	N-terminal GST	KIX (Proteintemplat T)
K3	7273 bp	pET-28a(+)	C-terminal His ₆	Met-Cys- A-HSP (cA-HSP)
K4	7273 bp	pET-28a(+)	C-terminal His ₆	Met-Ala- A-HSP (aA-HSP)
K5	7339 bp	pET-28a(+)	C-terminal His ₆	HSP-Cys-A (HSP-cA)
K6	7339 bp	pET-28a(+)	C-terminal His ₆	HSP-Ala-A (HSP-aA)
K7	7651 bp	pET-28a(+)	N-terminal GST	Cys- A-Luc (cA-Luc)

5.4.1 Gewinnung und Isolierung von Plasmid-DNA

In dieser Arbeit wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli*-One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R isoliert. Zu diesem Zweck wurde jeweils eine einzelne Kolonie einer Agarplatte über Nacht bei 37 °C in 5 mL LB-Medium kultiviert. Diese Kultur wurde am Folgetag für 5 min bei 20.000 g und RT zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen, sodass das Zellpellet erhalten blieb. Zur Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA wurde in dieser Arbeit das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma QIAGEN verwendet. Final wurde die Konzentration der jeweiligen Probe mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt (Kapitel 5.3.11).

5.4.2 Rekonstruktion der α -Sequenz mittels *Codon Usage*

Da die Sequenz von **A** bis dato nicht als Gen (α), sondern lediglich als Aminosäuresequenz (**A**) vorlag, musste diese zunächst revers-translatiert werden. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes zur Kodierung von Aminosäuren gab es diverse Möglichkeiten, die DNA-Sequenz zu generieren.^[312-313]

Aufgrund der Tatsache, dass die DNA-Sequenz später in *E. coli*-Stämmen exprimiert werden sollte, erfolgte eine Sequenzoptimierung hinsichtlich der *Codon Usage* (Codon Bias) zur Steigerung der Translationseffizienz. Dies geschah mithilfe des frei verfügbaren Internetprogramms *Sequence Manipulation Suite*.^[314] In den Sequenzen, in denen die gleiche Aminosäure mehrmals hintereinander codiert vorlag, erfolgte eine Variation der Triplet-Kompositionen, damit eine ausgeglichene Nutzung der zellulären tRNA-Stocks gewährleistet wurde. Folglich ergab sich für die Aminosäuresequenz von **A** (DDGNILPSDIMDFVLKNTPSW) die folgende DNA-Sequenz (Tabelle 18):

Tabelle 18: Mittels *Codon Usage* rekonstruierte α -Sequenz.

gatgacggcaacattctgccgtccgatattatggatthttgtgctgaaaaacaccccgctcctgg

5.4.3 Klonierung mittels Restriktion-Ligation

Das Restriktion-Ligation-Protokoll (*restriction ligation cloning*, RLC) beschreibt eine Klonierungsstrategie, bei der das Zielgen (Amplicon oder Insert) aus einem Ausgangsvektor via Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)^[315] isoliert und gleichzeitig

exponentiell amplifiziert wird. Anschließend wird das Amplifikat durch geeignete Restriktions- und Ligationsenzyme in den Zielvektor eingefügt. Die Klonierung des Zielgens in einen gewünschten Vektor setzt voraus, dass sowohl der Vektor als auch das Zielgenfragment kompatible Restriktionsschnittstellen besitzen. Diese Sequenzen werden ggf. durch geeignete Primer innerhalb der PCR flankierend an die DNA-Sequenz des Amplicons angefügt. Hierfür bedarf es zunächst der Erstellung geeigneter Primer.

Konstruktion geeigneter Primer

Für die Klonierung mittels Restriktion-Ligation sollten die eingesetzten Primer zwischen 20 und 30 Nukleotide lang sein, um eine spezifische Hybridisierung an die Templat-DNA zu gewährleisten. Zur Erlangung einer hinreichend hohen Schmelztemperatur sollte die Basenkomposition einen GC-Anteil von 50–60 % besitzen. Die Oligomere sollten keine Selbstkomplementarität aufweisen. Sollen zusätzliche flankierende Restriktionsschnittstellen in das Zielgen angefügt werden, so müssen die Erkennungssequenzen in die Primersequenz integriert werden.

Amplifikation des Zielgens mittels PCR

Zur Amplifikation eines Zielgens wurde ein 50 µL PCR-Ansatz erstellt (Tabelle 19). Die PCR erfolgte mithilfe der Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Kapitel 5.2), weshalb die vom Hersteller empfohlenen Angaben bezüglich optimaler Temperaturprofile berücksichtigt wurden. Ausnahmen betrafen die initiale Denaturierungstemperatur (Den.) sowie den finalen Elongationsschritt (Elo.). Diese zwei Schritte wurden erfahrungsgemäß entgegen dem Protokoll auf 3 min bzw. 5 min verlängert. In dieser Arbeit wurden alle PCRs unter Verwendung des Mastercyclers ep gradient S der Firma Eppendorf durchgeführt (Tabelle 20). Die PCR erfolgte stets in einem 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäß. Nach Beendigung der PCR erfolgte eine Überprüfung des Amplifikats mittels Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 5.3.1). Dabei wurde 1 µL des PCR-Produkts eingesetzt. War das Temperaturprofil erfolgreich und ergab eine scharfe und saubere Bande entsprechender Größe auf dem Agarosegel, so konnte der Ansatz im weiteren Verlauf verwendet werden. Bei unspezifischen Banden musste das Temperaturprofil gegebenenfalls optimiert werden.

Tabelle 19: Allgemeine Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes; vw. = vorwärts gerichtete Primersequenz, rw. = rückwärts gerichtete Primersequenz.

Komponente	Eingesetztes Volumen
Primer, vw.	5 µL
Primer, rw	5 µL
DNA-Templat	50 ng
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	25 µL
ddH ₂ O	Auf 50 µL auffüllen

Tabelle 20: Allgemeines Temperaturprofil für die Zielgenamplifikation; T_m = Schmelztemperatur, Den. = Denaturierung, Anl. = Anlagerung und Elo. = Elongation.

Temp.	99 °C	99 °C	(T _m + 3) °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer	3 min	1 s	5 s	15 s pro kb	5 min	∞
Vorgang	Den.	Den.	Anl.	Elo.	Elo.	Küh.
Zyklen	1	25			1	1

Isolierung und Reinigung des PCR-Amplifikats

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine DNA-Fällung zur Aufreinigung des Amplifikats in Anlehnung an das Protokoll zur alkalischen Lyse von Birnboim und Doly.^[316] Zu diesem Zweck wurde dem Restriktionsansatz zunächst das 0,1-fache des Ansatzvolumens an Natriumacetat (3 M, pH 4,8–5,6) hinzugefügt und sofort mit dem 2,5-fachen des Gesamtvolumens an Ethanol (100 %) vereinigt. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei RT inkubiert und für 10 min bei 20.000 g und RT zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde entfernt und das verbleibende DNA-Pellet mit dem 2-fachen Volumen an Ethanol (70 %) gewaschen. Der Ansatz wurde für 2 min bei 4 °C und 20.000 g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt um eine hinreichend hohe Produktreinheit zu gewährleisten. Der entstandene Überstand wurde entfernt, das Pellet für ca. 1 h bei 30 °C getrocknet und anschließend in 15 µL ddH₂O resuspendiert. Die Probe wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bei diesem Protokoll werden die zuvor eingesetzten Enzyme zwar denaturiert, sie verbleiben jedoch in der Probe, was am Ende als weißes Pellet erscheint. Dies hatte jedoch keinerlei Einfluss auf die Klonierungseffizienz. Final wurde die Konzentration der jeweiligen Probe unter Verwendung eines UV/VIS-Spektroskometers bestimmt (Kapitel 5.3.11).

Restriktion des PCR-Amplifikats

Die Zielgen-flankierenden Restriktionsschnittstellen, die ggf. zuvor durch die Primer innerhalb der PCR inseriert wurden, dienen nun der Generierung von für die Ligation mit dem Zielvektor benötigten spezifischen 5'- und 3'-Enden. Hierzu wurde ein 50 µL-Restriktionsansatz erstellt (Tabelle 21). Die Restriktion erfolgte für 30 min bei 37 °C. Anschließend erfolgte eine erneute Aufreinigung der Probe sowie die Konzentrationsbestimmung via UV/VIS-Spektroskopie (Kapitel 5.3.11).

Tabelle 21: Allgemeine Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes.

Komponente	Eingesetztes Volumen
10x FastDigest™ Buffer	5 µL
Amplifikat	ca. 0,4 µg
Restriktionsendonukleasen	2 µL pro Nuklease
ddH ₂ O	Auf 50 µL auffüllen

Restriktion des Zielvektors

Zum Einfügen des aufgereinigten PCR-Amplifikats in den isolierten Zielvektor, musste dieser zunächst mit den selektierten Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Um das Risiko einer potentiellen Religation entstehender Vektorfragmente zu verringern, wurde das aus dem Vektor herausgeschnittene Fragment mit einer weiteren spezifischen Restriktionsendonuklease geschnitten. Für die Restriktion wurde ein 100 µL-Reaktionsansatz erstellt (Tabelle 22). Die Restriktion erfolgte für 30 min bei 37 °C. Parallel wurde stets ein Kontrollansatz erstellt, in dem der Zielvektor mit einem der verwendeten Endonukleasen geschnitten und somit linearisiert wurde. Hierfür wurde ein entsprechender 10 µL-Restriktionsansatz angefertigt. Im Anschluss daran erfolgte eine Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 5.3.1) zur Kontrolle der Restriktionseffizienz.

Tabelle 22: Allgemeine Zusammensetzung der Restriktion des Zielvektors.

Komponente	Eingesetztes Volumen
10x FastDigest™ Buffer	10 µL
Plasmid-DNA	ca. 3 µg
Restriktionsendonukleasen	3 µL pro Nuklease
ddH ₂ O	Auf 100 µL auffüllen

Gelextraktion des verdauten Vektors

Die Reinigung des verdauten Vektors erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 5.3.1). Dafür wurde der gesamte Restriktionsansatz mit 20 µL 6x Ladepuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Zur Gewährleistung einer adäquaten Produktreinheit, wurde der 1x TAE-Puffer stets frisch aus einer 50x TAE-Stammlösung angefertigt (Kapitel 5.2.3). Anschließend wurde das Agarosegel mit dem UV Transilluminator der Firma UVP analysiert. Folgend wurde die gewünschte DNA-Bande mithilfe eines Skalpell's ausgeschnitten und geextrahiert. Für die Geextraktionen wurde in dieser Arbeit das E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit der Firma OMEGA bio-tek verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Dephosphorylierung des Zielvektors

Um eine eventuelle Religation des verdauten und aufgereinigten Vektors zu unterbinden, wurde das 5'-Ende des Vektors mittels Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase* (SAP)) dephosphoryliert. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll (Tabelle 23). Der Ansatz wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran musste die Phosphatase für 15 min bei 65 °C inaktiviert werden.

Tabelle 23: Allgemeine Zusammensetzung eines Dephosphorylierungsansatzes.

Komponente	Eingesetztes Volumen
Geextrahierter Vektor	6 µg
10x RX-Puffer	5 µL
Phosphatase (SAP)	3 µL

Ligation des Inserts mit dem Vektor

Die Ligation des Zielgens mit dem Zielvektor erfolgte unter Verwendung der T4 DNA-Ligase (Tabelle 24). Der Ansatz wurde für 2 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Transformation von One Shot[®] OmniMAX[™] 2 T1^R-Zellen analog zu Kapitel 5.5.2. Hierzu wurden 5 µL DNA-Lösung eingesetzt.

Tabelle 24: Allgemeine Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Komponente	Eingesetztes Volumen
T4 DNA Ligase Puffer	2 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L
geschnittener Vektor	50 ng
geschnittenes Amplifikat	20 ng
ddH ₂ O	Auf 20 μ L auffüllen

5.4.4 Ortsgerichtete Punktmutagenese

Das *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene stellt eine Möglichkeit dar, eine ortsgerechte Punktmutagenese vorzunehmen.^[317] Dabei kann es sich um eine Insertion, Deletion oder um einen Austausch von einzelnen Nukleotiden bis hin zu ganzen Basentriplets handeln. Innerhalb dieser Arbeit sollte auf diese Weise eine Gensequenz, die für ein Glycin kodiert, in eine Cystein-kodierende Sequenz umgewandelt werden. Aufgrund der besonderen Technik sind jedoch spezielle Bedingungen bei dem Design der Primer zu beachten, die folgend näher erläutert werden.

Design der Primer für die ortsgerechte Punktmutagenese

Die Primer müssen für jede Mutagenese individuell designt werden. Dabei müssen die Sequenzen beider Oligonukleotide exakt komplementär zueinander sein. Zudem müssen beide Primer die gewünschte Mutation enthalten, wobei die Mutation möglichst mittig in den Oligonukleotidsequenzen liegt und von mindestens 10 bis 15 Basen zu jeder Seite flankiert ist. Zur Sicherstellung hinreichend hoher Affinität und Stabilität zum DNA-Templat, sollte die Primerlänge im Bereich von 25 bis 45 Basenpaare liegen und die jeweilige Sequenz mit mindestens einem G oder C enden. Zudem sollten die Oligonukleotide eine Schmelztemperatur von 78 °C und einen GC-Gehalt von 40 % nicht unterschreiten.

Punktmutagenese und Amplifikation des Zielgens mittels QuickChange-PCR

Hierbei handelt es sich um eine linear verlaufende Polymerasereaktion (PR), da die Amplifikation des Amplicons nicht, wie bei einer herkömmlichen PCR, exponentiell verläuft. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in jedem neuen Zyklus ausschließlich der parentale

DNA-Strang als Matrize dient und nicht, wie bei einer herkömmlichen PCR, auch die jeweils entstehenden Tochterstränge.

Die Durchführung erfolgte nach mitgeliefertem Protokoll des Herstellers. Dabei bestimmt die Art der erwünschten Mutation die Anzahl der notwendigen Zyklen. Handelt es sich bei der Mutagenese um eine Punktmutation, so wurde ein Temperaturprofil verwendet, in dem 12 Zyklen zur Substitution des Nukleotids und Amplifikation der Genmutanten dienten. Für den Austausch von 2 Nukleobasen wurden, wie von Hersteller empfohlen, 16 Zyklen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mutageneseansatzes ist in Tabelle 25, das verwendete Temperaturprofil in Tabelle 26 beschrieben.

Nach Beendigung der PCR erfolgte eine Überprüfung der Amplifikation mittels Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 5.3.1). Dabei wurde 1 μL PCR-Produkt eingesetzt. War das Temperaturprofil erfolgreich und ergab eine klare spezifische Bande auf dem Agarosegel, so konnte der Ansatz im weiteren Verlauf verwendet werden. Bei unspezifischen Banden musste das Temperaturprofil ggf. optimiert werden. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Probe via UV/VIS-Spektroskopie, sowie die Restriktion der parentalen DNA mittels *DpnI*.

Tabelle 25: Allgemeine Zusammensetzung eines Mutageneseansatzes; vw. = vorwärts gerichtete Primersequenz, rw. = rückwärts gerichtete Primersequenz.

Komponente	Eingesetztes Volumen
10x Reaktionspuffer + MgSO_4	5 μL
DNA-Templat	50 ng
Pfu DNA-Polymerase	1 μL
Primer, vw.	125 ng
Primer, rw.	125 ng
dNTP Mix	1 μL
ddH ₂ O	Auf 50 μL auffüllen

Tabelle 26: Allgemeines Temperaturprofil der durchgeführten Mutagenese; T_m = Schmelztemperatur, Den. = Denaturierung, Anl. = Anlagerung, Elo. = Elongation und Küh. = Kühschritt. Für den Austausch von einer Nukleobase wurden 12 Zyklen, für den Austausch von 2 Nukleobasen 16 Zyklen durchgeführt.

Temp.	95 °C	95 °C	55 °C	68 °C	4 °C
Dauer	30 s	30 s	1 min	1 min pro kb	∞
Vorgang	Den.	Den.	Anl.	Elo.	Küh.
Zyklen	1	12 bzw. 16			1

DpnI-Restriktionsverdau der parentalen DNA

Der *DpnI*-Restriktionsverdau diente der Entfernung der parentalen DNA-Matrize aus dem Lösungsansatz. Da die parentale DNA zu Beginn aus *E. coli*-Zellen isoliert wurde, wird die Tatsache ausgenutzt, dass sie im Gegensatz zum Amplifikat, aufgrund der in den Zellen vorhandenen Deoxyadenosinmethyltransferase, dam-methyliert (m6A) vorliegt. Durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *DpnI* wird ein selektiver Abbau dieser methylierten DNA ermöglicht. Die generierten unmethylierten Amplifikate bleiben dabei erhalten. Zu diesem Zweck wurde der gesamte 50 μ L-PCR-Ansatz durch *DpnI* verdaut (Tabelle 27). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C.

Tabelle 27: Allgemeine Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes mittels *DpnI*.

Komponente	Eingesetztes Volumen
10x FastDigest™ Buffer	10 μ L
PCR-Amplifikat	50 μ L
FastDigest™ <i>DpnI</i>	4 μ L
ddH ₂ O	36 μ L

Transformation geeigneter E. coli-Zellen

Nach dem Verdau erfolgte eine Transformation von One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R-Zellen analog zu Kapitel 5.5.2. Dabei wurden jedoch ca. 1500 ng Ziel-DNA eingesetzt.

5.4.5 Klonierung mittels *in vivo cloning*

Das Prinzip des *in vivo cloning* (IVC), welches von der Firma BD Biosciences Clontech auch als *In-Fusion™ Cloning* bezeichnet wird, ist eine Methode,^[318] die die Ligation eines PCR-

Amplifikats mit einem geschnittenen Vektor nach dem Prinzip der intermolekularen homologen Rekombination *in vivo* ermöglicht.

Bei diesem Konzept handelt es sich um eine Weiterentwicklung des *ligation independent cloning* (LIC)^[319], in dem, im Gegensatz zum herkömmlichen Restriktion-Ligation-Protokoll, keine *in vitro* Ligation der zwei zu ligierenden Fragmente mittels Ligase erforderlich ist. Dies wird realisiert, indem durch die Wahl geeigneter Primer das Zielgen (blau) innerhalb der PCR-Amplifikation an beiden flankierenden Enden (3'- und 5'-Ende) identische homologe Sequenzen zum Zielvektor (schwarz) erhält (Abbildung 65). Die dabei homologen Sequenzabschnitte müssen mindestens 15 Nukleotide lang sein, wobei mit zunehmender Länge die Klonierungseffizienz zunimmt. Das Amplifikat wird gereinigt und zusammen mit dem linearisierten, aufgereinigten Vektor für 15 min bei RT inkubiert, um eine korrekte Vororientierung der Fragmente zu ermöglichen. Zur Ligation beider Fragmente Rekombination, werden One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R-Zellen mit der vor-inkubierten Suspension co-transformiert.

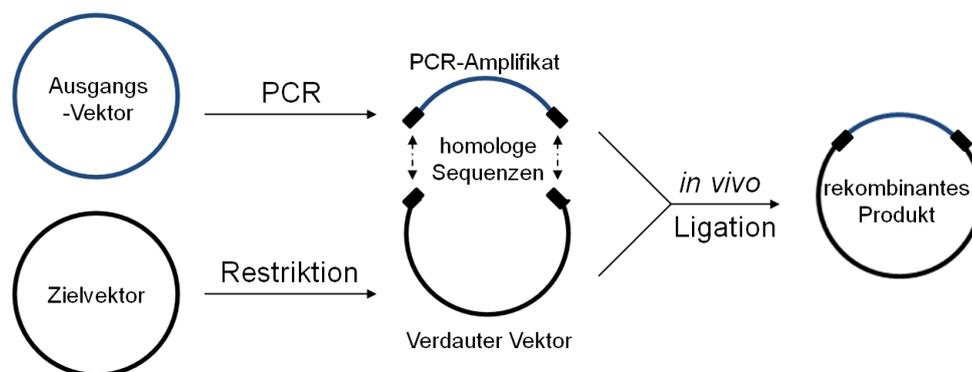


Abbildung 65: Prinzip des *in vivo clonings* (IVC). Homologe Bereiche zwischen PCR-Amplifikat und Zielvektor sind mit schwarzen Boxen markiert.

Konstruktion geeigneter Primer für das IVC

Im Hinblick auf das besondere Prinzip der Zielgenamplifikation und das simultane Einfügen von vektorspezifischen Sequenzen inklusive Restriktionsschnittstellen erfordert das IVC besondere Voraussetzungen bezüglich der Primerkonstruktion. Die Primer sollten mit mindestens 15 bis 20 Nukleobasen homolog zur Zielgensequenz und mit ähnlicher Länge homolog zum Zielvektor sein. Um eine hinreichende Sequenzspezifität des Oligonukleotids

zu gewährleisten, sollte eine Mindestgesamtlänge von ca. 45 Nukleotiden nicht unterschritten werden. Die Zielsequenz-spezifischen Bereiche beider Primer sollten eine ähnliche Schmelztemperatur von ca. 62 – 65 °C aufweisen. Zur Gewährleistung hinreichend hoher Spezifität und Stabilität der Primer innerhalb der PCR, sollten diese eine jeweilige Gesamtschmelztemperatur von mindestens 72 °C besitzen.

Amplifikation des Zielgens mittels PCR

Die Amplifikation des Zielgens erfolgte analog zu dem PCR-Profil der Restriktion-Ligation-Strategie (Kapitel 5.4.2). Eine Modifikation stellte die Aufteilung in zwei PCR-Intervalle dar. Dies ist wegen des besonderen Designs der Primer notwendig. Innerhalb der ersten fünf Zyklen erfolgte die Hybridisierung der Insert-spezifischen Sequenzen beider Oligonukleotide mit dem Zielgen sowie dessen Amplifikation. Dementsprechend musste eine suffiziente Anlagerungstemperatur gewählt werden. In einem anschließenden zweiten Amplifikationsintervall wurde innerhalb von 25 Zyklen die gesamte Sequenz jedes Primers mit amplifiziert. Daher wurde nun die Gesamtschmelztemperatur der Primer berücksichtigt (Tabelle 28).

Nach Beendigung der PCR erfolgte eine Überprüfung der Amplifikation mithilfe der Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 5.3.1). Hierzu wurde 1 µL PCR-Produkt eingesetzt. War das Temperaturprofil erfolgreich und ergab eine scharfe Bande entsprechender Größe auf dem Agarosegel, wurde der Ansatz im weiteren Verlauf verwendet. Bei unspezifischen Banden musste das Temperaturprofil ggf. optimiert werden. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Probe via UV/VIS-Spektroskopie sowie die *DpnI*-Restriktion der parentalen DNA (Kapitel 5.3.11 und Kapitel 5.4.4).

Tabelle 28: Allgemeines Temperaturprofil für die PCR zur Zielgenamplifikation für IVC; T_m = Schmelztemperatur, Den. = Denaturierung, Anl. = Anlagerung und Elo. = Elongation. Bedingt durch das Design der Primer besteht dieses PCR-Profil aus zwei Intervallzyklen. Überstieg die Schmelztemperatur des Primers bereits 72 °C, so wurde eine 2-Schritt-PCR durchgeführt, indem die jeweiligen Anlagerungs- und Elongationsschritte zusammengefasst wurden.

Temp.	99 °C	99 °C	($T_m + 3$) °C	72 °C	99 °C	($T_m + 3$) °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer	3 min	1 s	5 s	15 s pro kb	1 s	5 s	15 s pro kb	5 min	∞
Vorgang	Den.	Den.	Anl.	Elo.	Den.	Anl.	Elo.	Elo.	Küh.
Zyklen	1	5			25			1	1

Isolierung und Reinigung des PCR-Amplifikats

Die Aufreinigung des mit *DpnI* verdauten PCR-Amplifikats erfolgte analog zu Kapitel 5.4.2.

Restriktion des Zielvektors

Nach der Isolierung des PCR-Amplifikats erfolgte die Restriktion des Zielvektors analog zu Kapitel 5.4.2.

Gelextraktion des verdauten Vektors

Die Gelextraktion wurde entsprechend dem Kapitel 5.4.2 durchgeführt. Zur Ligation der Fragmente via IVC und zellulärer Amplifikation des rekombinanten Zielvektors folgte eine Transformation von One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R-Zellen (Kapitel 5.5.2). Final wurde die Konzentration der jeweiligen Probe via UV/VIS-Spektroskopie bestimmt (Kapitel 5.3.11). Um die Korrektheit des Zielkonstrukts zu überprüfen wurde abschließend eine Testrestriktion sowie eine DNA-Sequenzierung des erhaltenen Vektors durchgeführt (Kapitel 5.4.6 und Kapitel 5.4.7).

5.4.6 Testrestriktion von Plasmiden

Nach der Transformation von *E. coli*-Zellen mit dem jeweiligen Zielkonstrukt wurden am darauffolgenden Tag je fünf Kolonien von der Agarplatte entnommen und über Nacht kultiviert (Kapitel 5.5.4). Anschließend erfolgte die Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA (Kapitel 5.4.1). Die isolierten Vektoren wurden im Folgenden auf das Vorhandensein des Zielgens überprüft. Dieser Kontrollschritt erfolgte unter Verwendung von Zielkonstrukt-spezifischen Restriktionsendonukleasen, die den korrekten Zielgen-enthaltenen Vektor beispielsweise mehrfach und den religierten Ausgangsvektor einfach schneiden. Somit wird ein erfolgreich kloniertes Vektorkonstrukt auf einem anschließenden Agarosegel in zwei Fragmenten aufgetrennt vorliegen, wohingegen der leere Vektor lediglich eine einfache und klare Bande erzeugt. Dies ermöglicht eine Diskriminierung positiver und negativer Vektorkonstrukte. Letzteres ist erforderlich, da andernfalls eine Religation des verdauten Zielvektors nicht ausgeschlossen werden kann. In diesem Fall könnten die transformierten

Zellen die vektorintrinsic Antibiotikum-Resistenz nutzen und somit auf Antibiotikum-haltigen Agarplatten fortbestehen, ohne das Zielgen zu enthalten.

Solche falsch-positiven Kolonien werden durch die Testrestriktion der isolierten Plasmide detektiert und können daraufhin verworfen werden. Zur Durchführung der Testrestriktion wurde folgender 10 µL-Ansatz verwendet (Tabelle 29). Jeder Restriktionsansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese ausgewertet (Kapitel 5.3.1). Konnte ein Konstrukt mittels Testrestriktion positiv validiert werden, erfolgte eine abschließende DNA-Sequenzierung (Kapitel 5.4.7).

Tabelle 29: Allgemeine Zusammensetzung einer Testrestriktion.

Komponente	Eingesetztes Volumen
10x FastDigest™ Buffer	1 µL
Vektor	1 µL
Restriktionsendonukleasen	0,5 µL pro Nuklease
ddH ₂ O	Auf 10 µL auffüllen

5.4.7 DNA-Sequenzierung von Zielgenen

Für eine finale Kontrolle der genetischen Sequenz erfolgte zum Ende einer Klonierung eine Sequenzierung des Zielkonstrukts bei der Firma StarSeq®. Für eine Sequenzierung wurde, wie vom Hersteller gefordert, ein 7 µL-*U-mix*®-Sequenzierprobe erstellt (Tabelle 30). Das Sequenzierungsergebnis wurde mittels der Analysesoftware SnapGene® der Firma GSL Biotech LLC ausgewertet und via Sequenzvergleich mit der gewünschten DNA-Sequenz verglichen. Relevante Vektorkarten und zugehörige Sequenzierungsergebnisse der erstellten Konstrukte sind im Anhang den Kapiteln 9.5 und 9.6 zu entnehmen.

Tabelle 30: Allgemeine Zusammensetzung einer *U-mix*®-Sequenzierprobe; vw. = vorwärts gerichtete Primersequenz, rw. = rückwärts gerichtete Primersequenz.

Komponente	Eingesetztes Volumen
ddH ₂ O	5 µL
DNA-Templat	1 µL
Primer (vw. oder rw.)	1 µL

5.5 Zellbiologische Methoden

5.5.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen basiert auf einem im Institut etabliertem Protokoll für eine spätere Transformation der Zellen nach dem Prinzip der Calciumchlorid-Methode.^[320] Zunächst wurden 100 mL LB-Medium (*lysogeny broth*) mit einem Aliquot der kompetenten Zellen inokuliert. Diese Lösung wurde in einem autoklavierten 500 mL Erlenmeyerkolben bei 37 °C inkubiert, bis die optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm (OD_{600}) ca. 0,4 betrug. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis gelagert und für 10 min bei 3200 *g* und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 40 mL sterilem und kalt gelagertem $CaCl_2$ (0,1 M) resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend für 30 min auf Eis gelagert und für 10 min bei 3200 *g* und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Zellpellet mit 4,5 mL steriler und eiskalter Lagerlösung (4 mL $CaCl_2$ -Lösung (0,1 M) zzgl. 500 μ L Glycerol) resuspendiert, um die Zellen in auf Eis gelagerte 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße zu aliquotieren.

Dieser Schritt erfolgte schnellst möglich, da die resultierende Kompetenz der Zellen sensibel vom Einhalten der Kühlkette abhängt. Anschließend wurden die Aliquote in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.5.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transformationen erfolgten in Anlehnung an die von Okayama *et al.*^[321] und Hanahan^[322] konzipierten Protokolle. Die Transformationen unterschieden sich ggf. in der Menge und der Zusammensetzung der eingesetzten DNA und den zu transformierenden *E. coli*-Zellen.

Hitzeschock-Transformation von E. coli-Zellen zur Plasmid-Gewinnung

Für die Transformation zur späteren Plasmidisolierung (Kapitel 5.4.1) wurde ein Aliquot (100 μ L) One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R-Zellen auf Eis aufgetaut und 1 μ L Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben. Zur Durchführung des Hitzeschocks wurde der Ansatz zunächst für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 1 min bei 42 °C gelagert. Nachfolgend wurden die

Zellen für 2 min auf Eis inkubiert, mit 500 µL SOC-Medium (*super optimal broth with catabolite repressor*) vermischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden 100 µL der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Der verbleibende Zellansatz wurde kurz (*short spin*) herunter zentrifugiert und ein Großteil des Überstands entfernt. Das Zellpellet wurde im verbliebenen Medium (ca. 50–100 µL) resuspendiert und auf eine separate LB-Agarplatte ausgestrichen. Diese Platte diente zur Sicherheit falls auf der ersten Platte zu wenige Zellen ausplattiert wurden. Es folgte eine Inkubation beider Platten über Nacht bei 37 °C.

Hitzeschock-Transformation von E. coli-Zellen für IVC

Analog der Transformation zur Plasmidgewinnung mit der Ausnahme, dass in Schritt 2 nun 100 ng verdauter und Gel-aufgereinigter Vektor mit 1000 ng aufgereinigtem PCR-Amplifikat für 15 min gemeinsam in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß bei RT inkubiert wurden. Dabei wurden maximal 15 µL an DNA eingesetzt, da chemisch-kompetente Zellen empfindlich gegen zu hohe Mengen an DNA sind.^[323] Erst im Anschluss daran erfolgte eine Inkubation auf Eis für 5 min, um damit 100 µL One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R-Zellen zu transformieren.

Hitzeschock-Transformation zur Expression des Zielproteins

Analog der Transformation zur Plasmidgewinnung mit der Ausnahme, dass hier ein geeigneter *E. coli*-Expressionsstamm (BL21-Gold(DE3)) statt dem Klonierungsstamm (One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R-Zellen) mit dem Vektor transformiert wurde.

5.5.3 Erstellen von Glycerol-Lagerkulturen

Zur Erstellung von Glycerol-Lagerkulturen wurden ausschließlich One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R-Zellen transformiert (Kapitel 5.5.2), da Expressionsstämme während längerer Lagerung eine höhere Tendenz aufweisen, den Zielvektor abzubauen oder abzustoßen. Nach erfolgter Transformation wurden einzelne Kolonien von der LB-Agarplatte entnommen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 bei 37°C inkubiert. Dies war notwendig, da sich die Zellen zu einem möglichst hohen Anteil in der log-Phase des Zellwachstums befinden sollten. Nun wurden 600 µL Zellkultur mit 200 µL sterilem, 80 %igem Glycerol (final 20 %) vermischt und für ca.

30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.5.4 Kultivierung von *E. coli*-Zellen zur Gewinnung von Plasmid-DNA

Für die Kultivierung von *E. coli*-Zellen zur anschließenden Plasmidisolierung wurde der LB-Agarplatte eine vereinzelte rundliche Zellkolonie entnommen. Die Kolonie wurde in einer 13 mL-Kulturröhre der Firma Sarstedt mit 3 mL LB-Medium, welches zuvor mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde (Kapitel 5.2.5), über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA mittels Kit aus den Zellkulturen isoliert (Kapitel 5.4.1).

5.5.5 Erstellung von Expressionskulturen

Zur Selektion Zielvektor-haltiger Zellen wurden sämtlichen Medien vektorspezifische Antibiotika in benötigter Konzentration beigefügt (Kapitel 5.2.5). Zu diesem Zweck erfolgte eine Dopelselektion auf den zur Transformation verwendeten Agarplatten sowie in den zur Expression erstellten Vorkulturen. Hierfür wurde sowohl die Resistenz des Vektors (Kapitel 5.1.1) als auch die endogene Resistenz der verwendeten Zellen (Kapitel 5.1.2) ausgenutzt. Erst bei den eigentlichen Expressionskulturen wurde die Resistenz des Vektors ausgenutzt, um eine maximale Zellausbeute zu erzielen. Zur Vermeidung von Kontaminationen, wurden sämtliche verwendete Kolben und Kulturröhren vor Verwendung autoklaviert und unter sterilen Bedingungen eingesetzt. Während eines jeden Expressionsexperiments erfolgte die Anfertigung einer Kontrollprobe, bei der die Expressionsinduktion entfiel. Auf diese Weise konnte das endogene Expressionsspektrum der jeweiligen Zellkultur bewerten werden.

Ansetzen einer Testexpressionskultur

Zur Evaluierung des Expressionslevels eines neuen Zielproteins, wurde von jedem Konstrukt zunächst eine Testexpression im kleinen Maßstab (50 mL) durchgeführt. Für die Durchführung einer Testexpression wurden kompetente *E. coli*-BL21-Gold(DE3) Zellen mit dem Zielgen-enthaltenden Vektor transformiert (Kapitel 5.5.2), auf LB-Agarplatten

ausplattiert und anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden 50 mL TB-Medium in einen 250 mL-Erlenmeyerkolben gegeben, mit ca. 10 Kolonien der LB-Agarplatte inokuliert und bei 37 °C und 150 rpm in einem Inkubationsschüttler (Innova™ 4430 Incubator Shaker) der Firma New Brunswick Scientific bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 inkubiert. Anschließend erfolgte die Expressionsinduktion mittels Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, final 0,5 mM, s. Kapitel 5.2.7). Die Testexpression erfolgte für 3 h bei 30 °C und 150 rpm. Im Anschluss daran wurde der Expressionsansatz für 10 min auf Eis gekühlt und für 20 min bei 4 °C und 4.000 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet bis zum Zellaufschluss bei -80 °C gelagert.

Ansetzen einer Expressionskultur zur Aufreinigung von Zielproteinen

Nach erfolgreicher Testexpression mit hinreichend hohem Expressionslevel wurde eine Expressionskultur im großen Maßstab (2,5 L) zur späteren Isolierung und Aufreinigung des Zielproteins angefertigt. Für die Durchführung einer Expression erfolgte zunächst eine Transformation kompetenter *E. coli*-BL21-Gold(DE3)-Zellen mit Zielgen-enthaltendem Vektor (Kapitel 5.5.2). Diese wurden anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 20 mL TB-Medium in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben gemischt, mit ca. 5 Kolonien der LB-Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm in einem Inkubationsschüttler (Innova™ 4430 Incubator Shaker) der Firma New Brunswick Scientific inkubiert. Einen weiteren Tag später erfolgte die Inokulation von 2,5 L TB-Medium mit der Übernacht-Kultur. Dafür wurde dem frischen TB-Medium so viel Volumen der Übernacht-Kultur beigefügt, dass daraus eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 resultierte. Diese Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Expressionsinduktion mittels IPTG (final 0,5 mM, Kapitel 5.2.7). Die Expression erfolgte über Nacht bei 18 °C und 150 rpm. Am Folgetag wurde der Expressionsansatz für 20 min bei 4 °C und 4.000 g zentrifugiert und der dabei entstandene Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde bis zum Zellaufschluss bei -80 °C gelagert.

5.6 Methoden zur Proteinaufreinigung

Die Zusammensetzungen der bei den Zellaufschlüssen und Aufreinigungen eingesetzten Puffer sind dem jeweiligen Abschnitt des Kapitels 5.6.3 zu entnehmen. Eine Übersicht der finalen Proteinsequenzen und deren berechneten Proteinparameter sind dem Anhang Kapitel 9.4 zu entnehmen.

5.6.1 Zellaufschluss mittels Ultraschallhomogenisator

Bei dem Zellaufschluss mittels Ultraschallhomogenisator erfolgt der Zellaufschluss via Kavitation. Hierbei wird eine durch den Ultraschallstab erzeugte Hochfrequenz in mechanische Schwingung umgewandelt und in das mit Zellen suspendierte Medium übertragen. Dabei entstehen luftleere Kavitationsblasen, die durch den entstehenden Dampfdruck der verdampfenden Flüssigkeit implodieren. Die bei diesem Prozess entstehenden Flüssigkeitsstrahlen treffen mit hoher Geschwindigkeit auf die sich im Medium befindlichen Zellen und zerstören diese. Zudem prallen die Zellen durch die Druckwellen aufeinander und zerbersten durch die entstehenden Aufprallkräfte. Aufgrund der hierbei entstehenden Wärme musste die Zellsuspension während der gesamten Prozedur in einem Eisbad gekühlt werden. In dieser Arbeit wurde ein Ultraschallhomogenisator (Digital Sonifier®) der Firma Branson eingesetzt. Dabei erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschallstab aufgrund seines geringen benötigten Probenvolumens ausschließlich für den Aufschluss von Testexpressionskulturen.

Für den Aufschluss wurden die bei -80 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend in 1 mL Lysepuffer pro 0,5 g Zellpellet (w/w) resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen in drei Zyklen, unter Verwendung eines Ultraschallstabs für je 30 s bei 80 % Leistung, auf Eis aufgeschlossen. Zwischen den jeweiligen Zyklen wurde eine Inkubation auf Eis für 1 min durchgeführt, um das Zelllysate nicht durch die bei der Prozedur entstehende Wärme zu überhitzen. Das Zelllysate wurde für 50 min bei 4 °C und 25.000 g zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und bis zur Verwendung auf Presseis gelagert.

5.6.2 Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator

Für große Aufschlussansätze wurde ein Hochdruckhomogenisator (Microfluidizer®) der Firma Microfluidics Corporation eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein schonendes Aufschlussverfahren, bei dem die Zellen zunächst via Hochdruck stark komprimiert und anschließend durch schnelle Druckentspannung aufgeschlossen werden.

Für den Zellaufschluss wurden die bei -80 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und in 100 mL Lysepuffer pro 2,5 L Kultur resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend in vier Wiederholungszyklen mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Die homogenisierte Suspension wurde für 50 min bei 4 °C und 25.000 g zentrifugiert und der dabei entstandene Überstand bis zur Verwendung auf Presseis gelagert.

5.6.3 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Aufreinigung mittels Ni-NTA-Säule

Zur Aufreinigung mithilfe des His₆-Tags wurde eine HisTrap FF crude 5 mL-Säule der Firma GE Healthcare verwendet. Innerhalb der Aufreinigung wurden die in der Tabelle 31 angegebenen Puffer eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Größenausschlusschromatographie zur weiteren Aufreinigung des Zielproteins (Kapitel 5.6.4).

Tabelle 31: Puffer zur Aufreinigung von Zielproteinen via Ni-NTA-Säule; PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,4), 500 mM NaCl, 2 mM TCEP, 2 mM PMSF, DNaseI
Waschpuffer I	50 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM Imidazol
Waschpuffer II	50 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM TCEP, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM TCEP, 300 mM Imidazol
Gelfiltration	25 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl, 1 mM TCEP

Aufreinigung mittels GSH-Säule

Zur Aufreinigung mithilfe GST-Tag wurde eine Glutathione Sepharose 4 Fast Flow-Säule der Firma GE Healthcare verwendet. Innerhalb der Aufreinigung wurden die in der Tabelle 32

angegebenen Puffer und Volumina eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Größenausschlusschromatographie zur weiteren Aufreinigung des Zielproteins (Kapitel 5.6.4). Die aufgereinigte Probe wurde anschließend mittels TEV-Protease prozessiert, um den *N*-terminalen GST-Tag zu entfernen.^[284, 324] Zu diesem Zweck wurden 0,05 mg TEV-Protease pro 1 mg Fusionsprotein eingesetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Tabelle 32: Puffer zur Aufreinigung von Zielproteinen via GSH-Säule; SV = Säulenvolumina.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,4), 500 mM NaCl, 2 mM PMSF, DNaseI
WaschpufferI	50 mM HEPES (pH 7,4), 500 mM NaCl
WaschpufferII	50 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl
Elutionspuffer	50 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl, 20 mM GSH
Gelfiltration	25 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl

5.6.4 Größenausschlusschromatographie

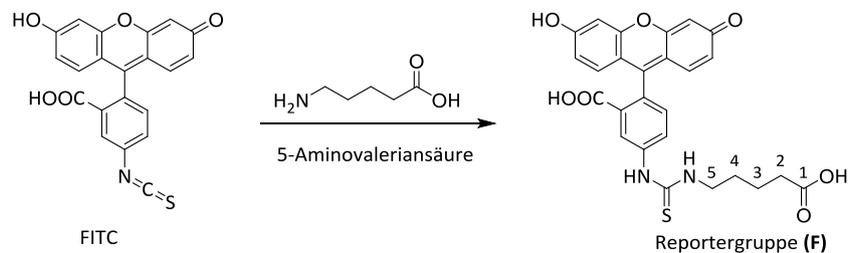
Bei der Größenausschlusschromatographie handelt es sich um eine Flüssigkeitschromatographie, bei der gelöste Probeninhalte entsprechend ihres hydrodynamischen Volumens aufgetrennt werden.^[287] Dabei werden größere Moleküle früher aus dem System eluiert, während kleine Moleküle tiefer in das poröse Säulenmaterial eindringen können und somit länger zurück gehalten werden. Für die Größenausschlusschromatographie wurden Gelfiltrationssäulen (HiLoad 16/600 Superdex 75 µg bzw. HiLoad 16/600 Superdex 200 µg) der Firma GE Healthcare eingesetzt. Der jeweils verwendete Puffer wurde dem aufzureinigenden Protein angepasst (Tabelle 31 bzw. der Tabelle 32).

5.6.5 Ultrafiltration zur Konzentrierung des Zielproteins

Die Konzentrierung des isolierten Zielproteins erfolgte mittels Ultrafiltration in Zentrifugenfiltern (*amicon ultra centrifugal filter units*) der Firma Millipore™. Dabei ist zu beachten, dass die Ausschlussgrenze (*cut-off*) des verwendeten Filters mindestens 20 % geringer ist als die Molmasse *M* des Zielproteins. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

Die proteinhaltige Probe wurde in 20-minütigen Intervallen bei 4 °C und 4.000 g zentrifugiert, bis sie das gewünschte Zielvolumen bzw. die gewünschte Konzentration an Zielprotein aufwies. Dabei erfolgte die Bestimmung der Konzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie (Kapitel 5.3.11). Gesetz dem Fall, dass der aktuelle Puffer, indem sich das Protein befand, nicht für die folgenden Anwendungen geeignet war, wurde mit dieser Methode gleichzeitig ein Pufferwechsel vorgenommen. Anschließend wurde das Proteinkonzentrat in auf Eis gekühlte 0,2 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.7 Synthesen von Reportergruppen (F)



Die Synthese der Reportergruppe (F) wurde in Anlehnung der Publikation von Petersson *et al.*^[325] durchgeführt. Die Modifikationen betreffen eingesetzte Mengen und Äquivalente der Edukte sowie Volumina der verwendeten Lösungsmittel. Für die Synthese wurden 500 mg FITC (1,29 mmol) in 3 mL DMSO gelöst und tropfenweise zu einer Lösung aus 500 mg 5-Aminovaleriansäure (4,27 mmol) in 250 mL 0,1 M NaHCO₃ (pH 9,0) gegeben. Die Reaktion erfolgte unter Lichtausschluss bei 30 °C über Nacht. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer (Vacuum Controller V-850) der Firma Büchi entfernt, sodass ein öliges Produkt entstand. Dieses wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und via Gefriertrocknung vom restlichen Lösungsmittel befreit. Das entstandene Pulver wurde in Wasser mit 30 % ACN gelöst und mithilfe von semi-präparativer HPLC unter Verwendung von Gradient 13 isoliert (Kapitel 5.3.8). Das zugehörige HPLC-Chromatogramm sowie das ESI-MS-Spektrum sind dem Kapitel 9.8 zu entnehmen.

Ausbeute: $\eta = 514$ mg (1,01 mmol, 79 %).

$C_{26}H_{22}N_2O_7S$ ($M = 506,53$ g mol⁻¹).

T_m : 203,1 °C.

HPLC: $t_R = 9,8$ min (Gradient 8).

ESI-MS (m/z): ber. für $C_{26}H_{23}N_2O_7S$ $[M+H]^+$: 507,5, gef. 507,1

ber. für $C_{26}H_{24}N_2O_7S$ $[M+2H]^{2+}$: 254,3, gef. 254,0.

HRMS (m/z): ber. für $C_{26}H_{23}N_2O_7S$ $[M+H]^+$: 507,1148, gef. 507,1226.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6,67 (s, 1H; CH, Ar); 6,67 (s, 1H; CH, Ar); 6,60 (d, 2H, $J = 8,6$; CH, Ar); 6,56 (d, 1H, $J = 8,6$; CH, Ar); 6,56 (d, 1H, $J = 8,7$; CH, Ar); 7,74 (d, 1H, $J = 8,6$; CH, Ar); 8,09 (br, 1H; CH, Ar); 8,23 (s, 1H, $J = 8,6$; CH, Ar); 10,10 (br, 1H; ArCOOH); 10,10 (br, 1H; ArNHCSNH); 7,17 (d, 1H, $J = 8,3$; ArNHCSNH); 1,58 (m, 4H; CH₂); 2,27 (t, 2H, $J=6,6$; CH₂); 3,51 (m, 2H; CH₂); 9,86 (br, 1H; COOH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 174,31 (CH, Ar); 168,48 (CH, Ar); 159,43 (CH, Ar); 151,84 (CH, Ar); 128,99 (CH, Ar); 112,54 (CH, Ar); 109,71 (CH, Ar); 102,20 (CH, Ar); 88,07 (CH, Ar); 43,43 (CH₂⁵); 33,34 (CH₂²); 27,90 (CH₂⁴); 21,94 (CH₂³).

5.8 Manuelle Festphasensynthese von Peptiden

Sämtliche Peptide wurden nach dem Protokoll der Fmoc-basierten Peptidfestphasensynthese (SPPS) hergestellt.^[326] Aufgrund einfacher Handhabung erfolgten die Synthesen in Filterspritzen (PP-reactor with PE frit 1–10 mL) der Firma MultiSynTech GmbH. Als Harz wurde, wenn nicht anders berichtet, ein Rink-Amide-MBHA(p-Methylbenzhydrylamin)-Harz der Firma Merck Millipore verwendet, um nach der finalen stark sauren Abspaltung mittels TFA ein C-terminales Amid statt einer Carbonsäure zu erhalten (Abbildung 66).

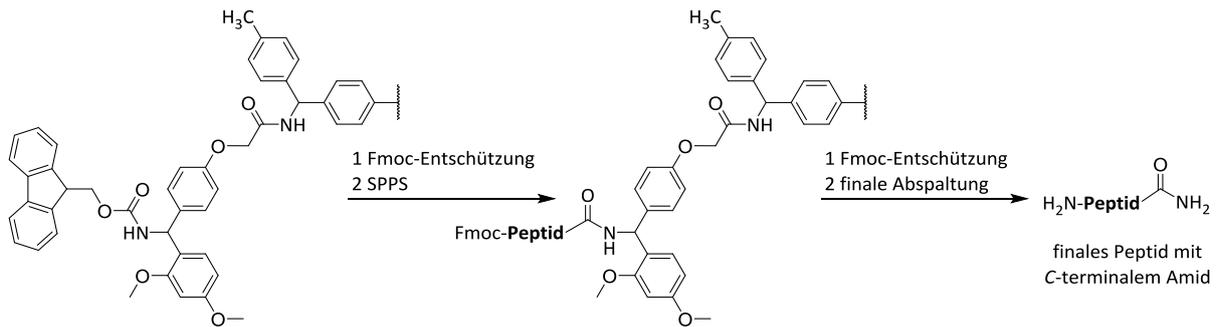


Abbildung 66: Schema der Peptidfestphasensynthese mittels Rink-Amide-MBHA-Harz zur Generierung eines C-terminalen Amids am finalen Peptid; MBHA = p-Methylbenzhydrylamin und Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl.

Nach jeder Kupplung wurde das Harz 3x mit *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), 3x mit Dichlormethan (DCM) und erneut 3x mit NMP gewaschen. Wurde für einen speziellen Kupplungs- oder Entschützungsschritt das Lösemittel auf DCM gewechselt, so erfolgte der letzte Waschschrift mit 6x DCM. Entsprechend wurde verfahren, wenn von DCM auf NMP gewechselt wurde. Alle Schritte, die eine Inkubationszeit benötigten, wurden auf einem Schüttler (KS 130 basic) der Firma IKA® bei 320 rpm und RT durchgeführt. Eine Übersicht der in dieser Arbeit erstellten Peptidvarianten ist in der folgenden Tabelle 33, eine Übersicht der verwendeten Modifikationen in der darauffolgenden Abbildung 67 dargestellt. Zugehörige HPLC-Chromatogramme und MS-Spektren sowie explizite Peptidsequenzen sind dem Kapitel 9.7 zu entnehmen.

Tabelle 33: Übersicht der in dieser Arbeit synthetisierten Peptide inklusive MS- und HRMS-Analytik; (ber.) = berechnet, (gef.) = gefunden, (t_R) Retentionszeit.

Peptid	Summenformel	ber. M / g·mol ⁻¹	HPLC t_R / min	MS		HRMS	
				ber. m/z	gef. m/z	ber. m/z	gef. m/z
A0	C ₁₀₈ H ₁₆₄ N ₂₆ O ₃₅ S	2418,68	9,5 (Gradient7)	1210,3	1210,0	1261,0833	1261,0957
A0*	C ₁₃₃ H ₁₈₄ N ₂₈ O ₄₂ S ₂	2911,18	11,0 (Gradient7)	1456,6	1455,9	-	-
A1	C ₁₁₁ H ₁₆₉ N ₂₇ O ₃₆ S ₂	2521,82	9,8 (Gradient7)	1261,9	1261,5	-	-
A2*	C ₁₁₆ H ₁₆₇ N ₂₅ O ₃₄ S ₂	2519,84	12,2 (Gradient6)	1260,9/840,9/631,0	1260,6/840,6/630,9	-	-
A3*	C ₁₁₃ H ₁₆₂ N ₂₄ O ₃₂ S ₂	2432,77	12,5 (Gradient6)	1217,4/811,9/609,2	1217,1/811,7/609,1	-	-
A4*	C ₁₀₈ H ₁₅₅ N ₂₃ O ₃₁ S ₂	2335,65	12,4 (Gradient6)	1168,8/779,6/584,9	1168,5/779,3/585,0	-	-
A5	C ₁₁₀ H ₁₆₉ N ₂₈ O ₃₃ S ₂	2486,63	14,7 (Gradient9)	1244,3/829,9/622,7	1244,7/830,4/623,1	1243,5971	1243,5975
A6	C ₁₀₂ H ₁₅₉ N ₂₆ O ₂₇ S ₂	2256,45	15,0 (Gradient9)	1129,2/753,2/565,1	1129,9/753,7/565,4	1128,5701	1128,5782
B0	C ₁₃₇ H ₂₃₄ N ₄₈ O ₄₇ P ₁	3322,58	10,5 (Gradient5)	1162,3/1108,5/831,7/665,5	1662,0/1108,1/831,6/665,6	-	-
B0*	C ₁₆₂ H ₂₅₄ N ₄₉ O ₅₄ P ₅	3815,08	11,8 (Gradient5)	1908,5/1272,7/954,8/764,0	1908,4/1272,2/954,7/764,0	-	-
B0*(pS133D)	C ₁₆₃ H ₂₅₃ N ₄₉ O ₅₂ S	3763,12	6,2 (Gradient6)	1882,6/1255,4/941,8/753,6	1882,4/1255,1/941,9/753,5	-	-
B0*(pS133E)	C ₁₆₄ H ₂₅₅ N ₄₉ O ₅₂ S	3777,14	6,0 (Gradient6)	1889,6/1260,0/945,3/756,4	1898,9/1260,1/954,2/756,8	-	-
B0*(pS133S)	C ₁₆₂ H ₂₅₃ N ₄₉ O ₅₁ S	3735,10	11,8 (Gradient5)	1246,0/934,8/748,0/623,5	1245,6/934,8/748,2/623,4	-	-
B1	C ₁₄₉ H ₂₅₀ N ₄₉ O ₅₂ P	3590,85	10,8 (Gradient5)	1796,4/1198,0/898,7/719,2	1796,0/1197,8/898,5/719,0	718,7632	718,7740
B2	C ₁₄₄ H ₂₄₅ N ₄₈ O ₅₀ P	3479,75	10,7 (Gradient5)	1160,9/870,9/697,0	1160,7/870,7/7696,9	-	-
B3	C ₁₄₇ H ₂₅₂ N ₄₉ O ₅₀ P	3536,85	10,4 (Gradient5)	1769,4/1180,0/885,2/708,4	1768,8/1179,5/885,1/708,4	-	-
B4	C ₁₄₃ H ₂₄₄ ClN ₄₈ O ₅₀ P	3502,19	10,6 (Gradient5)	1168,4/876,6/701,4/584,7	1168,1/876,8/701,4/584,7	875,9363/700,9490	875,9440/700,9568
B4*	C ₁₇₀ H ₂₆₇ ClN ₅₁ O ₅₆ PS	4019,74	12,0 (Gradient5)	1340,9/1005,9/805,0	1340,8/1005,7/804,9	804,3752/670,4793	804,3853/670,4898
B5	C ₁₄₃ H ₂₄₄ FN ₄₈ O ₅₀ P	3485,73	10,6 (Gradient5)	1162,9/872,4/698,2	1162,6/872,3/698,1	-	-
B6*	C ₁₅₆ H ₂₄₀ N ₄₇ O ₅₃ PS	3684,90	8,9 (Gradient8)	1843,5/1229,3/922,2/738,0	1843,6/1228,9/921,9/738,0	-	-
B7*	C ₁₅₆ H ₂₄₀ N ₄₇ O ₅₄ PS	3700,90	8,9 (Gradient8)	1851,5/1234,6/926,2/741,2	1851,0/1234,4/926,2/741,1	-	-
D*	C ₁₆₆ H ₂₅₆ ClN ₄₉ O ₅₆ PS ₂	3929,21	7,8 (Gradient8)	1965,6/1310,7/983,3/786,8	1965,7/1310,4/983,0/786,7	1309,9290	1309,9301

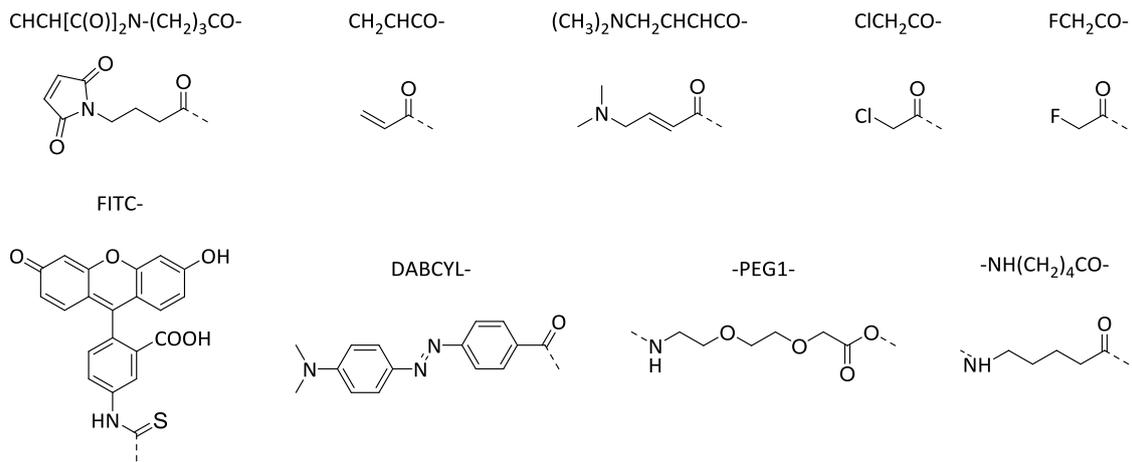


Abbildung 67: In dieser Arbeit verwendete Peptidmodifikationen.

5.8.1 Quellen des Harzes

Zur Sicherstellung einer effektiven Oberflächenzugänglichkeit für die folgenden Kupplungsschritte wurde das Harz zu Beginn einer Peptidsynthese für 30 min in DCM gequellt. Anschließend wurde es auf NMP eingestellt (s. o.).

5.8.2 Selektive Entschützung von Schutzgruppen

Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Innerhalb der Peptidsynthese wurde die Fmoc-(Fluorenylmethoxycarbonyl)Schutzgruppe zum temporären Schutz der *N*-terminalen primären Amine von Aminosäurebausteine eingesetzt. Die selektive Entschützung erfolgt dabei mittels der Base Piperidin, welche ein sekundäres Amin enthält. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit einer NMP-Lösung abgespalten, die 25 % Piperidin als Base enthielt. Die Entschützung erfolgte stets durch 2x Inkubation des zu entschützenden Harzes für je 5 min. Zur Kontrolle der Kupplungseffizienz und der zu erwartenden Ausbeute, erfolgte nach jedem vierten Kupplungsschritt ein sogenanntes *Fmoc-monotoring*. Zu diesem Zweck wurde die Konzentration des bei der Abspaltung entstehenden Dibenzofulven-Piperidin Addukts bei 295 nm mithilfe der UV/VIS-Spektroskopie ermittelt (Kapitel 5.3.11).

Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe

Die (4-Methoxyphenyl)diphenylmethyl-Schutzgruppe (Mmt) wurde zur selektiven Entschützung von Lys und Cys eingesetzt.^[327] Da die abgespaltene Mmt-Schutzgruppe eine gelbliche Farbe in der Lösung erzeugt, konnte dies als Indikator verwendet werden, um den Entschützungsgrad zu verfolgen. Auf diese Weise wurde die Entschützung wiederholt, bis der Entschützungsansatz eine klare Farbe annahm. Zwischen den Inkubationen mit Entschützungslösung wurde das Harz stets 3x mit DCM gewaschen. Da Peptide unter stark sauren Bedingungen vom verwendeten Rink-Amide-MBHA-Harz abgespalten werden könnten, wurden 2 – 5 % TFA in der jeweiligen Abspalllösung eingesetzt. Auf diese Weise wurde ausschließlich die Mmt-Schutzgruppe entfernt, ohne das Peptid vom Harz freizusetzen.

Im Falle von Mmt-geschütztem Lysin wurde das sich am Harz befindliche Peptid zunächst 3x 1 min mit einer DCM gewaschen. Die Mmt-Schutzgruppe wurde mittels einer Lösung aus TFA/TIPS/DCM (2:5:100) bei einmaliger Wiederholung für je 5 min entfernt.

Im Falle von Mmt-geschütztem Cystein wurde das sich am Harz befindliche Peptid zunächst 3x 1 min mit einer DCM-Lösung, die 1 % TFA enthielt gewaschen. Anschließend erfolgte die Entschützung der Mmt-Schutzgruppe mithilfe von 5 % TFA in DCM für 4x 10min.

5.8.3 Kupplung

Alle Kupplungsschritte wurden zweimalig, wenn nicht anders beschrieben, in NMP mit 4 Äq. PyBOP^[328-331] und 8 Äq. DIPEA für je 3 h bei RT durchgeführt. Ausnahmen stellten die Kupplungen der Reportergruppe **F** auf die Thiofunktion des *N*-terminalen Cysteins dar. Aufgrund geringerer Kupplungseffizienz wurden hier 8 Äq. Baustein, 8 Äq. PyBOP und 16 Äq. DIPEA eingesetzt.

5.8.4 Capping

Nach jeder zweimaligen Kupplung eines Bausteins an die *N*-terminale Aminogruppe des zu synthetisierenden Peptids wurde eine Acetylierung (*capping*) der nicht reagierten und somit frei verbliebenen Aminogruppen mittels Essigsäureanhydrid durchgeführt. Zu diesem Zweck

wurde das Peptid für 10 min mit einer Lösung aus Ac₂O/DIPEA/NMP (1:1:10) bei RT inkubiert.

5.8.5 Finale Abspaltung

Nachdem das Peptid am Harz aufgebaut wurde, erfolgte in einem finalen Schritt dessen Abspaltung vom Harz. Bedingt durch die Verwendung einer hochprozentigen TFA-Lösung erfolgte simultan die Abspaltung aller permanenten Schutzgruppen. Es wurden den Abspalllösungen Abfangreagenzien (*scavenger*), wie z. B. 1,2-Ethandithiol (EDT), Triisopropylsilan (TIPS) und H₂O zugefügt, um Nebenreaktionen mit reaktiven Kationen zu unterdrücken. Alle Abspaltungen wurden in Filterspritzen durchgeführt.

Nach der Inkubation des Peptids mit der jeweiligen Abspaltungslösung wurde die peptidhaltige Lösung durch die Spritze abgetrennt und anschließend mittels Stickstoffstrom auf ein minimales Volumen eingeeengt. Anschließend erfolgte stets eine Peptidfällung mittels Diethylether (Et₂O),^[332] der zuvor bei -20 °C gelagert wurde. Der Ether wurde dabei mindestens in einem 10-fachen Überschuss eingesetzt, um eine quantitative Fällung des Peptids zu gewährleisten. Zur Erhöhung der Effizienz erfolgte die Inkubation des Etherhaltigen Ansatzes bei -20 °C für 20 min. Nach Zentrifugation bei 4 °C und max. *g* für 10 min wurde der Ether-haltige Überstand entfernt und das vorhandene Pellet mit eiskaltem Et₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet unter Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurde es in einer Lösung aus ddH₂O und 20 % bis 30 % Acetonitril (ACN) gelöst und auf die HPLC-MS zur Analyse gegeben. Dabei wurde der Gradient 8 verwendet. Im Falle der Testabspaltung wurde von einem zweiten Waschschrift mit Et₂O abgesehen. Eine detaillierte Beschreibung der in dieser Arbeit erfolgten Abspaltungsprotokolle ist im Folgenden aufgeführt:

Testabspaltung von Peptiden

Für die Überprüfung der korrekten Peptidsequenz während oder am Ende einer Peptidsynthese wurde stets eine Testabspaltung, d. h. eine Abspaltung des Peptids vom Harz im kleinen Maßstab durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine geringe Menge der Probe mit einer Lösung bestehend aus TFA/H₂O/ODT/TIPS (94:2,5:2,5:1) für 1 h inkubiert.

Komplettabspaltung von Peptiden

Konnte das Zielpeptid durch die Testabspaltung als korrekt validiert werden, wurde im Anschluss eine Abspaltung des kompletten Peptidansatzes vom Harz durchgeführt. Dies erfolgte mittels einer Lösung bestehend aus TFA/H₂O/EDT/TIPS (94:2,5:2,5:1) für 4 h.

Abspaltung von Thioester-haltigen Peptiden

Enthielt das Peptid eine labile Thioesterfunktion, so wurde eine Lösung bestehend aus TFA/TIPS (99:1) verwendet, da andernfalls eine eventuelle Hydro- bzw. Thiolyse des Esters durch H₂O oder Thiol-haltige Abfangreagenzien erfolgen konnte.

5.9 Automatisierte Festphasensynthese von Peptiden

In dieser Arbeit wurden ausschließlich die Peptid-Grundsequenzen von **B** mittels automatisierter Synthese erstellt. Alle weiteren Kupplungen von Bausteinen sowie finale Modifikationen und Abspaltungen vom Harz wurden manuell beschrieben durchgeführt (Kapitel 5.8). Innerhalb der Peptidsynthese unter Verwendung des 433A Peptide Synthesizers der Firma Applied Biosystems wurde ein Rink-Amide(SpheriTide™)-Harz der Firma Merck Millipore verwendet, um nach der finalen Abspaltung ein C-terminales Amid statt einer Carbonsäure zu erhalten.

Das Syntheseprotokoll verlief dabei nach dem Chemistry File FastMoc 0,25 mmol MonPrevPK (Monitoring während der Fmoc-Entschützung). Demnach wurde, unabhängig von der Größe des Syntheseansatzes, jeweils 1 mol Aminosäure pro Kupplungsschritt eingesetzt. Als Kupplungslösungen wurden 0,45 M 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) in Dimethylformamid (DMF) sowie 2 M DIPEA in NMP verwendet. Für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde 2 % DBU und eine Lösung aus 2 % Piperidin in NMP verwendet. Die Waschschrte wurden mit NMP und DCM durchgeführt. Ein Cappingsschritt wurde nicht verwendet; stattdessen wurden Doppelkupplungen benutzt.

5.10 Verfolgung von Reaktionsverläufen

5.10.1 Versuche zu Verknüpfungsreaktionen

Zur Verfolgung des Verlaufs der Ligationsreaktionen wurde eine analytische HPLC (1200 Series) der Firma Agilent Technologies verwendet. Als Säule wurde eine Zorbax Eclipse XDB-C18 reverse-phase column (4,6 x 150 mm, Partikelgröße 5 μm) der Firma Agilent eingesetzt. Alle Gradienten enthielten einen finalen Waschschrift mit 95 % B für 5 min (A entspricht dem Anteil von Wasser (ddH₂O) und B dem Anteil an ACN). Beiden Laufmitteln (A und B) wurde je 0,1 % TFA zugefügt. Die verwendeten Gradienten sind im Folgenden angegeben:

- Gradient 1: 20 % B auf 40 % B in 20 min
- Gradient 2: 20 % B auf 30 % B in 30 min
- Gradient 3: 25 % B auf 45 % B in 20 min
- Gradient 4: 35 % B auf 45 % B in 20 min

Initiale Testreaktionen mit Glutathion

Zu Beginn wurde von jedem der Peptide **B1** – **B5** ein lagerfähiger 4 mM DMSO-Stock angefertigt. Aus diesem wurde für jede Messung ein frischer Arbeitsstock (0,3 mM) in Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,4) erstellt. Zur Erstellung eines 20 mM **GSH**-Stocks wurde Glutathion (**GSH**) in entsprechender Menge Natriumphosphatpuffer (20 mM mit 4 mM TCEP, pH 7.4) gelöst. Dabei diente TCEP als mildes Reduktionsmittel, um eventuelle Disulfidbrücken der Thiofunktionen von **GSH** quantitativ zu reduzieren. Diese Lösung wurde anschließend für 30 min bei 30 °C inkubiert. Zum Start der Reaktionen wurde die jeweilige Peptidlösung mit dem **GSH**-Puffer im Verhältnis von eins zu eins und einem finalen Volumen von 20 μL gemischt (finale Konzentrationen 0,15 mM **B1** – **B5**, 10 mM **GSH** und 2 mM TCEP in 20 mM Natriumphosphatpuffer mit einem pH 7.4). Alle Reaktionen wurden bei 30 °C durchgeführt. Abschließend wurden die Reaktionen mit 1 μL TFA (5 % v/v) gestoppt.

Der Fortschritt der Reaktion wurde mithilfe analytischer HPLC (Kapitel 5.3.8) verfolgt. Dabei diente der Gradient 1 der Vermessung von **B1**, **B2**, **B4** und **B5** und der Gradient 2 der Vermessung von **B3**. Die Bestimmung der Produktausbeute erfolgte via Integration der

Signalflächen bei 210 nm (Originalwerte siehe Kapitel 9.8). Die Anfangsgeschwindigkeiten (v) wurden basierend auf dem linearen Bereich des Konzentration-zu-Zeit-Verlaufs bestimmt. Zur Berechnung der relativen Anfangsgeschwindigkeit ($v_{rel.}$) diente **B4** als Referenzpunkt durch den sämtliche Anfangsgeschwindigkeiten der restlichen Peptide (**B1 – B5**) dividiert wurden (Formel 2). Zum eindeutigen Produktnachweis wurde eine MALDI-TOF-MS-Analyse durchgeführt (Kapitel 5.3.7).

$$v_{rel.} = v(\mathbf{BX}) \cdot v(\mathbf{B4})^{-1}$$

Formel 2: Berechnung der relativen Anfangsgeschwindigkeit $v_{rel.}$ für die Peptide **B1 – B5**; $X = 1 – 5$.

Templat-vermittelte Verknüpfungsreaktionen mit Peptid B4

Zu Beginn wurde der Natriumphosphatpuffer (20 mM) auf den benötigten pH-Wert eingestellt. Die Peptide wurden separat in DMSO gelöst, um Stocks mit einer Konzentration von 4 mM zu erhalten. Pro Reaktionsansatz wurden 40 μ M Peptid **A** mit 40 μ M TCEP in 20 mM Natriumphosphat mit entsprechendem pH (7,4, 8,4, 9,4) für 30 min bei 30 °C inkubiert (**Stock-A**). Anschließend wurden 40 μ M Peptid **B4** einmal mit und einmal ohne 40 μ M Proteintemplat frisch in Natriumphosphatpuffer angesetzt (**Stock-B4 \pm T**). Zum Start der Reaktion wurden 12,5 μ L **Stock-A** und 12,5 μ L **Stock-B4 \pm T** zusammengefügt, sodass jede Komponente mit einer finalen Konzentration von 20 μ M vorlag. Die Reaktion wurde bei 30 °C durchgeführt. Abschließend wurden die Reaktionen mit 1,3 μ L TFA (5 % v/v) gestoppt. Zur Analyse des Reaktionsfortschrittes wurden 26 μ L der Reaktionslösung für die analytische HPLC verwendet. Für die HPLC wurde der Gradient 3 eingesetzt (Kapitel 5.3.8).

Die Produktausbeute wurde mithilfe von Integration der Signalflächen bestimmt. Eine Beschreibung der Datenverarbeitung ist in diesem Kapitel dem Abschnitt 'Prozessierung der kinetischen Daten' zu entnehmen. Um das Produkt eindeutig nachweisen zu können, wurde die Produktfraktion via analytischer HPLC unter Verwendung des Gradienten 4 isoliert und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert (Kapitel 5.3.7).

*Verknüpfungsreaktionen mit Peptid **B1***

Zu Beginn wurde der Natriumphosphatpuffer (20 mM) auf den benötigten pH-Wert eingestellt. Die Peptide wurden separat in DMSO gelöst, um Stocks mit einer Konzentration von 4 mM zu erhalten. Pro Reaktionsansatz wurden 11,5 μM Peptid **A** mit 10 μM TCEP in 20 mM Natriumphosphat mit entsprechendem pH (7,4, 5,9, 4,4) für 30 min bei 0 °C inkubiert (**Stock-A**). Anschließend wurden 10 μM Peptid **B1** einmal mit und einmal ohne 10 μM Proteintemplat frisch in Natriumphosphatpuffer angesetzt (**Stock-B1 \pm T**). Zum Start der Reaktion wurden 50 μL **Stock-A** und 50 μL **Stock-B1 \pm T** zusammengefügt, sodass die Komponenten mit einer finalen Konzentrationen von 5 μM (**B1** und ggf. **T**) und 5,75 μM (**A**) vorlagen. Die Reaktion wurde bei 0 °C durchgeführt. Final wurden die Reaktionen mit 5,25 μL TFA (5 % v/v) gestoppt. Zur Analyse des Reaktionsfortschrittes wurden 100 μL der Reaktionslösung für die analytische HPLC verwendet. Für die HPLC wurde der Gradient 3 eingesetzt (Kapitel 5.3.8). Die Produktausbeute wurde durch Integration der Signalflächen bestimmt. Eine genaue Beschreibung der Datenverarbeitung ist in diesem Kapitel dem Abschnitt 'Prozessierung der kinetischen Daten' zu entnehmen. Zum eindeutigen Nachweis des Produkts wurde die Produktfraktion via analytischer HPLC unter Verwendung des Gradienten 4 isoliert und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert (Kapitel 5.3.7).

Prozessierung der kinetischen Daten

Die Chromatogramme bei 210 nm zur Bestimmung der kinetischen Daten wurden automatisch mithilfe des Programms Xcalibur™ ausgewertet. Die aus der Auswertung resultierenden Signalflächen wurden verwendet, damit sowohl die Produktbildung als auch die Konzentrationen berechnet werden konnten. Die Anfangsgeschwindigkeiten (v) wurden basierend auf dem linearen Bereich des Konzentration-zu-Zeit-Verlaufs bestimmt. Wenn Datenpunkte unter 45 % Ausbeute fehlten, so wurden höhere Ausbeuten zur Berechnung der initialen Reaktionsrate verwendet und als untere Grenze definiert (dies war der Fall für **B1+G-SH** und **B1+A(+T)** bei pH 5,9 und pH 7,4). In den Fällen, in denen kein Produkt detektiert werden konnte, wurde die untere Detektionsgrenze der HPLC ermittelt und als obere Grenze angegeben. Dabei entsprachen 1 % **B5+G-SH** und 6 % **B4+A(-T)** einer rekalkulierten Stoffmenge von 2 nmol des jeweiligen Peptids. Die Beschleunigungsraten

($\alpha = v(+T)/v(-T)$) wurden basierend auf den initial Reaktionsraten (v) in Gegenwart (+T) und Abwesenheit (-T) von Proteintemplat berechnet.

Markierung von gereinigtem Zielprotein mittels Verknüpfungsreaktion

Zu Beginn wurden Stocklösungen (**HSP-Stock**) der zu markierenden Proteinvarianten (**cA-HSP**, **HSP-cA**, **_AA-HSP**, **HSP-_AA**) mit einer Konzentration von 40 μM in Natriumphosphatpuffer (20 mM mit 40 μM TCEP, pH 7,4) hergestellt und für 30 min bei RT inkubiert, um die vorhandenen Cysteine vollständig zu reduzieren. Zudem wurden 40 μM FITC-markierten Peptids **B4*** (aus einem 4 mM DMSO-Stock) und ggf. 40 μM Proteintemplat in 20 mM Natriumphosphatpuffer vorgelegt (**B4* \pm T-Stock**). Zum Reaktionsstart wurden 12,5 μL des jeweiligen **HSP-Stocks** zusammen mit 12,5 μL **B4* \pm T-Stock** vermischt, um eine finale Konzentration von je 20 μM zu erhalten. Dieser Reaktionsansatz wurde bei 30 °C inkubiert. Letztlich wurden 2 μL der Reaktionslösung mit 13 μL SDS-Probenpuffer vereint und für 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Markierungsreaktion zu stoppen und die Proben für eine SDS-PAGE vorzubereiten. Zur Visualisierung der erfolgreichen Markierung des Zielproteins wurde anschließend die SDS-PAGE durchgeführt (Kapitel 5.3.2). Zu diesem Zweck wurden 7 μL der jeweiligen Probe in eine separate Geltasche geladen. Das resultierende SDS-Gel wurde mittels Fluoreszenzlesegerät ausgelesen (Kapitel 5.3.12). Abschließend wurden alle Proteinbanden durch Coomassie-Färbung kenntlich gemacht.

Markierung von Zielprotein in Zelllysate mittels Verknüpfungsreaktion

Zu Beginn wurde die vom Überstand befreite Expressionskultur mittels Ultraschallhomogenisator (Kapitel 5.6.1) aufgeschlossen, durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit und das Zelllysate auf eine Gesamtproteinkonzentration von ca. 140 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ eingestellt. Diese **cA-HSP**- bzw. **HSP-cA**-haltigen Lysate wurden mit 20 mM Natriumphosphat (pH 7,4) weiter auf 35 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Gesamtprotein verdünnt und in Gegenwart von 40 μM TCEP für 30 min bei 30 °C inkubiert. Des Weiteren wurde aus einem 4 mM DMSO-Stock eine 40 μM Lösung FITC-markierten Peptids **B4*** und ggf. 40 μM Proteintemplat in 20 mM Natriumphosphat (pH 7,4) erstellt (**B4* \pm T-Stock**). Zum Start der Reaktion wurden je 12,5 μL der 40 μM -Stocklösungen zusammen pipettiert, wodurch **B4***

und ggf. **T** eine finale Konzentration von 20 μM besaßen. Diese Reaktionslösungen wurden anschließend bei 30 °C inkubiert. Zum Schluss wurden 2 μL der Reaktionslösung mit 13 μL SDS-Probenpuffer vereint und für 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Markierungsreaktion zu stoppen und die Proben für eine SDS-PAGE vorzubereiten. Zur Visualisierung der erfolgreichen Markierung der Zielproteine wurde anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt (Kapitel 5.3.2). Das resultierende SDS-Gel wurde via Fluoreszenzlesegerät ausgelesen (Kapitel 5.3.12). Abschließend wurden alle Proteinbanden durch Coomassie-Färbung kenntlich gemacht.

5.10.2 Versuche zu Transferreaktionen

HPLC-basierter Nachweis der Templat-vermittelten Transferreaktionen

Die Peptide **A5** und **D*** wurden separat in DMSO gelöst, um Stocks mit einer Konzentration von 4 mM zu erhalten. Pro Reaktionsansatz wurden 10 μM Peptid **A5** mit 500 μM TCEP in 20 mM Natriumphosphat bei pH 7,4 für 30 min bei 30 °C inkubiert (**Stock-A5**). Anschließend wurden 5 μM Peptid **D*** einmal mit und einmal ohne 5 μM Proteintemplat frisch in 20 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7,4 angesetzt (**Stock-D*±T**). Für den Reaktionsstart wurden 50 μL **Stock-A5** und 50 μL **Stock-D*±T** zusammengefügt, sodass die Komponenten mit finalen Konzentrationen von 5 μM (**A5**) und 2,5 μM (**D*** und ggf. **T**) inklusive 250 μM TCEP vorlagen. Die Reaktion wurde bei 30 °C durchgeführt. Zum Schluss wurden die Reaktionen mit 5 μL TFA (5 % v/v) gestoppt.

Zur Analyse des Reaktionsfortschrittes wurden 100 μL der Reaktionslösung für die analytische HPLC verwendet. Für die HPLC wurde der Gradient 9 eingesetzt (Kapitel 5.3.8). Die Produktausbeute wurde mittels Integration der Signalflächen bestimmt. Die Transferprodukte **A5*** und **D** wurden unter Verwendung der ESI-MS nachgewiesen.

Zur Bestimmung der Transferausbeute wurden die Peaks von **D** und **D*** berücksichtigt, da **D*** zu Reaktionsbeginn im Gegensatz zu **A5** im Unterschuss vorlag. Da im Signal von **D*** eine kleine Unreinheit mit gleicher Retentionszeit wie **D***, trotz optimierter Aufreinigung verblieb, konnte hier lediglich ein Mindestwert für die Produktausbeute berechnet werden, da die Unreinheit selbst bei längerer Reaktionsdauer inert im Signal verblieb.

Fluoreszenz-basierte Verfolgung von Transferreaktionen

Für die fluoreszenzbasierte Verfolgung der Transferreaktionen wurde zunächst der Natriumphosphatpuffer (20 mM NaPi + 3 % HEPES, 500 μ M TCEP, 0,01 % Tween-20) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Dieser Puffer wurde für alle weiteren Schritte eingesetzt. Da **T** bereits HEPES enthielt, konnten somit eventuelle Einflüsse der HEPES-Konzentration durch Verwendung unterschiedlicher Mengen an **T** ausgeschlossen werden. Die Peptide wurden separat auf eine Konzentration von 2 mM in DMSO eingestellt. Diese lagerfähigen Stocks wurden vor jeder Messung frisch auf eine Konzentration von 50 μ M durch Puffer verdünnt. Pro Reaktionsansatz wurden 20 μ M Akzeptorligand **A** mit 500 μ M TCEP in Puffer für 30 min bei RT inkubiert. Vor jedem Ansatz wurde die Konzentration von **T** durch UV/VIS-Spektroskopie bestimmt (Kapitel 5.3.11) und mittels Puffer auf eine Konzentration von 1 mM gebracht. Anschließend wurden 10 μ M Donorligand **D*** (ggf. mit entsprechender Menge **T**) in Puffer angesetzt. Zum Start der Reaktion wurden 10 μ L des jeweiligen Akzeptorliganden und 10 μ L Donorligand mit bzw. ohne Templat (**D*±T**) zusammengefügt, sodass final 5 μ M **D***, 10 μ M **A** und 250 μ M TCEP in 20 μ L Gesamtvolumen vorhanden waren. Die Konzentrationen von **T** entsprachen dabei je nach Probe 0 Äq., 0,02 Äq., 0,05 Äq., 0,1 Äq., 0,25 Äq. und 1 Äq.. Um einen Standard innerhalb der Messungen zu besitzen, wurde stets eine Probe, die ausschließlich 5 μ M Reportergruppe **F** in 20 μ L Puffer enthielt, simultan vermessen.

Zum Auslesen der Proben wurde ein Mikrotiterplattenlesegerät (Safire² plate reader) der Firma Tecan mit einer eingestellten Anregungswellenlänge (*excitation wavelength*) λ_{ex} von 470 nm und einer Emissionswellenlänge λ_{em} von 525 nm verwendet. Die vom System verwendeten Bandbreiten betragen 20 nm (Anregungsbandbreite) und 5 nm (Emissionsbandbreite). Die Verstärkung (*gain*) wurde bei jeder Messung vom Gerät optimal eingestellt. Es wurden 50 Messungen pro Messpunkt mit einer Integrationszeit von 2000 μ s durchgeführt. Alle Messungen wurden für 5 h bei 30 °C durchgeführt. Durch die zeitliche Verzögerung aufgrund technischer Gegebenheiten konnte die erste Messung nach einer Inkubation von 2 min durchgeführt werden. Die bis dahin erfolgte Fluoreszenzlöschung wurde innerhalb der Kinetikberechnung nicht berücksichtigt werden, wodurch die tatsächlichen Anfangsgeschwindigkeiten wahrscheinlich höher waren, als angegeben.

Prozessierung der kinetischen Daten

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität (I) wurden sämtliche erhaltenen Rohdaten $I_{\text{roh}}(X)$ durch den entsprechenden Wert des internen Standards F ($I_{\text{roh}}(F)$) dividiert (Formel 3). Dabei steht X für den jeweiligen Probenansatz (0 – 1 Äq. T) innerhalb der jeweiligen Messung.

$$I = [I_{\text{roh}}(X) \cdot I_{\text{roh}}(F)^{-1}]$$

Formel 3: Berechnung der Fluoreszenzintensität I ; $I_{\text{roh}} =$ aus den Messungen mittels Mikrotiterplattenlesegerät erhaltene Rohdaten, $X =$ jeweiliger Probenansatz (0 – 1 Äq. T), $F =$ verwendete Reportergruppe.

Basierend auf den tatsächlichen Fluoreszenzdaten wurden die resultierenden Transferausbeuten η berechnet (Formel 4). Zu diesem Zweck wurde der jeweilige Minimalwert $I_{\text{min}}(1T)$ aus den Messungen von 1 Äq. T von den zuvor durch F dividierten Werten subtrahiert. Um sämtliche Startwerte auf den Ursprung beziehen zu können, wurden die Daten anschließend durch ihren korrespondierenden Startwert $I_0(X)$ dividiert. Zur Erstellung eines Graphen mit steigender Fluoreszenzlöschung statt abnehmender Fluoreszenzintensität wurden die erhaltenen Werte final von 1 (\cong 100 %) abgezogen. Somit ergaben sich die tatsächlichen Transferausbeuten η der angesetzten Proben zum jeweiligen Zeitpunkt t .

$$\eta = 1 - [(I - I_{\text{min}}(1T)) \cdot I_0(X)^{-1}]$$

Formel 4: Berechnung der Transferausbeute η für den jeweiligen Messzeitpunkt; $I =$ tatsächliche Fluoreszenzintensität, $I_{\text{min}}(1T) =$ jeweilige Minimalwert der Messungen von 1 Äq. T , $I_0(X) =$ Startwert des Probenansatzes (0–1 Äq. T).

Die Wechselzahl WZ beschreibt die Effizienz eines Katalysators (hier T) und gibt die Anzahl umgesetzter Stoffmenge pro katalytischem Zentrum an.^[333] In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselzahl basierend auf den Transferausbeuten Templat-vermittelter und -unvermittelter Reaktionen berechnet (Formel 5). Dazu wurde die Ausbeute der unvermittelten Reaktion von der Ausbeute der mit X Äq. Templat-vermittelten Reaktion subtrahiert. Anschließend wurde das Resultat auf die eingesetzten Äq. an T ($X = 0 - 1$) bezogen, indem eine Division durch diese erfolgte.

$$WZ = [\eta(X \text{ Äq. } \mathbf{T}) - \eta(\text{ohne } \mathbf{T})] \cdot X^{-1}$$

Formel 5: Berechnung der Wechselzahl WZ ; η = Transferausbeute, X = eingesetzte Äquivalente (0 – 1 Äq.) von \mathbf{T} .

Markierung von aufgereinigtem Zielprotein mittels Transferreaktion

Zu Beginn wurde eine Stocklösung der zu markierenden Luciferase α **A-Luc** mit einer Konzentration von 2 μM in Natriumphosphatpuffer (20 mM mit 500 mM TCEP, pH 7,4) hergestellt und für 30 min bei RT inkubiert (**Luc-Stock**). Zudem wurden 2 μM des mit FITC-markierten Donorliganden \mathbf{D}^* (aus einem 4 mM DMSO-Stock) mit ggf. 1 Äq. \mathbf{T} in 20 mM Natriumphosphatpuffer vorgelegt (**$\mathbf{D}^* \pm \mathbf{T}$ -Stock**). Zum Reaktionsstart wurden 50 μL **Luc-Stock** mit 50 μL **$\mathbf{D}^* \pm \mathbf{T}$ -Stock** zusammen gegeben, um finale Konzentrationen von je 1 μM \mathbf{D}^* , **Luc** und ggf. \mathbf{T} sowie 250 μM TCEP zu erhalten. Dieser Reaktionsansatz wurde bei 30 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion und zur Vorbereitung der Proben für eine anschließende SDS-PAGE wurden zu vordefinierten Zeitpunkten 6 μL der jeweiligen Reaktionslösung mit 4 μL SDS-Probenpuffer vereint und für 5 min bei 95 °C inkubiert.

Zur Visualisierung der erfolgreichen Markierung des Zielproteins wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Kapitel 5.3.2), wobei 10 μL der jeweiligen Probe in eine separate Geltasche geladen wurden. Das resultierende SDS-Gel wurde mittels Fluoreszenzlesegerät ausgelesen (Kapitel 5.3.12) und anschließend via Coomassie-Färbung gefärbt um vorhandene Proteinbanden sichtbar zu machen.

6 Abkürzungen und Akronyme

DNA-Nukleotide werden entsprechend der UPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur durch den Einbuchstabencode in Kleinbuchstaben und Aminosäuren durch den Ein- oder Dreibuchstabencode in Großbuchstaben abgekürzt. Unter Berücksichtigung der allgemeinen Konvention werden Gene in kursiven Kleinbuchstaben (z. B. *kix*) und deren resultierenden Proteine in Normalschrift (*recte*) mit Großbuchstaben (z. B. KIX) beschrieben.

% v/v	Volumenprozent
A	Peptid A für Verknüpfungsreaktion bzw. Akzeptorligand für Transferreaktion
a	DNA-Sequenz zur Generierung des Peptids A (TAD)
<i>a</i>	Reaktionsbeschleunigung
a.u.	<i>arbitrary units</i> (dt. willkürliche Einheit)
abs.	absolut
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AgPl	Agarplatte
Anl.	Anlagerung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Äq.	Äquivalent(e)
AS	Aminosäure
AZ	Aktives Zentrum eines Proteins/Enzyms
B	Peptid B
b	DNA-Sequenz zur Generierung des Peptids B (pKID)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz
BME	β-Mercaptoethanol
bp	<i>basepair</i> (dt. Basenpaar)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (dt. Rinderserumalbumin)

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-bindendes Protein
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i> (dt. cAMP-Response-Element-bindendes Protein)
D	Donorligand (entspricht einer Variante des Peptids B)
DABCYL	4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoyl
dam	DNA-[N6-Adenin]Methyltransferase/ Deoxyadenosin-Methyltransferase
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	doppeltdeionisiertes Wasser
Den.	Denaturierung
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
E	Elektrophil
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced</i> (dt. verbessertes) grün fluoreszierendes Protein
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (dt. Enzym-gekoppeltes Antikörper-basiertes Nachweisverfahren)
Elo.	Elongation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (dt. und andere)
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
F	FITC tragende Reportergruppe
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FP	Fluoreszenzpolarisation
gB	gBlock
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor

GSH	Glutathion (innerhalb der Kinetikmessungen wurde es fett markiert (GSH))
GST	Glutathion-S-Transferasen
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
hCAII	humane Carboanhydrase II
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (dt. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
HSP	Hitzeschockprotein (hier HSP70)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IUP	intrinsisch unstrukturiertes Protein
IVC	<i>in vivo cloning</i>
K1 – K7	jeder in dieser Arbeit erstellte Vektorkor besitzt eine Konstruktnummer K1 bis K7
LB	<i>lysogeny broth</i>
LIC	<i>ligation independent cloning</i> (dt. Ligation-unabhängige Klonierung)
Luc	Firefly Luciferase Luc2 aus dem Leuchtkäfer <i>Photinus pyralis</i>
M	Molmasse
m6A	Adenin mit methyliertem Stickstoff in der Position 6 (dam-Methylierung)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MBHA	p-Methylbenzhydrylamin
MeOH	Methanol
Mmt	4-Monomethoxytrityl
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i> (dt. molekulare Masse)
MWS	<i>molecular weight standard</i> (dt. molekularer Standardmarker)
NaPi	Natriumphosphat
NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i> (dt. Nickel-Nitrilotriessigsäure)
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (dt. Kernspinresonanz)
ODT	1,8-Octandithiol
P	Reaktionsprodukt
P01 – P19	Primer P01 bis P19, welche in dieser Arbeit Verwendung fanden
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PEG1	Polyethylenglycol-Einheit (8-Amino-3,6-dioxaoctanoyl-Einheit)
pI	isoelektrischer Punkt
pKID	<i>phosphorylated kinase-inducible-domain</i> (dt. phosphorylierte Kinase-induzierbare Domäne)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pS bzw. Ser	phosphoryliertes Serin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
rw.	rückwärts gerichteter Primer
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (dt. Natriumdodecylsulfat)
Sek.	Sekundär
SH3	Src-homology 3-Domäne
sm	<i>small molecule</i> (dt. niedermolekulare Verbindung)
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repressor</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (dt. Peptidfestphasensynthese)
SV	Säulenvolumen(ina)
T	Proteintemplat (hier die KIX-Domäne aus CBP)
TAD	<i>transcription activation domain</i> (transkriptionsaktivierende Domäne)
TAE	TRIS-Acetat-EDT
TB	<i>terrific broth</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i> (dt. Tris-gepufferte Salzlösung)
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>

TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
T _m	Schmelztemperatur
TOF	<i>time-of-flight</i> (dt. Flugzeit-Massenspektrometer)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
<i>v</i>	Anfangsgeschwindigkeit
<i>v_{rel}</i>	relative Anfangsgeschwindigkeit
<i>v/v</i>	Volumen pro Volumen
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIS	<i>visible</i> (dt. sichtbarer Bereich des elektromagnetischen Spektrums)
vw.	vorwärts gerichteter Primer
w/v	weight per volume (dt. Gewicht pro Volumen)
WZ	Wechselzahl
η	Ausbeute

7 Literaturverzeichnis

- [1] X. Y. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2004**, *43*, 4848-4870.
- [2] D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525-528.
- [3] B. Rubinov, N. Wagner, H. Rapaport, G. Ashkenasy, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2009**, *48*, 6683-6686.
- [4] K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. R. Ghadiri, *Chem.-Eur. J.* **1997**, *3*, 1017-1024.
- [5] S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10559-10560.
- [6] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1986**, *25*, 932-935.
- [7] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nature* **1987**, *327*, 346-347.
- [8] R. E. Kleiner, C. E. Dumelin, D. R. Liu, *Chemical Society reviews* **2011**, *40*, 5707-5717.
- [9] P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chemical reviews* **2006**, *106*, 3652-3711.
- [10] R. R. Araghi, B. Kokschi, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3544-3546.
- [11] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2011**, *21*, 4993-4997.
- [12] K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, *389*, 706-709.
- [13] N. Brauckhoff, G. Hahne, J. T. Yeh, T. N. Grossmann, *Angewandte Chemie* **2014**, *53*, 4337-4340.
- [14] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [15] P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu Rev Biochem* **2000**, *69*, 923-960.
- [16] K. Gorska, N. Winssinger, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2013**, *52*, 6820-6843.
- [17] L. E. Orgel, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **2004**, *39*, 99-123.
- [18] J. Strick, *Journal of the history of biology* **1999**, *32*, 51-92.
- [19] G. F. Joyce, *Nature* **2002**, *420*, 278-279.
- [20] C. Bohler, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578-581.
- [21] M. Bolli, R. Micura, A. Eschenmoser, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 309-320.
- [22] G. Ertem, J. P. Ferris, *Nature* **1996**, *379*, 238-240.
- [23] M. K. Herrlein, J. S. Nelson, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10151-10152.
- [24] T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7666-7667.
- [25] A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, *396*, 245-248.

- [26] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722-2728.
- [27] L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109-118.
- [28] G. Arrhenius, J. L. Bada, G. F. Joyce, A. Lazcano, S. Miller, L. E. Orgel, *Science* **1999**, *283*, 792.
- [29] J. P. Ferris, G. Ertem, *Science* **1992**, *257*, 1387-1389.
- [30] J. P. Ferris, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J Mol Biol* **1968**, *33*, 693-704.
- [31] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J Mol Biol* **1972**, *67*, 25-33.
- [32] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618.
- [33] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Science* **1968**, *161*, 64-66.
- [34] L. E. Orgel, *Nature* **1992**, *358*, 203-209.
- [35] M. P. Robertson, S. L. Miller, *Nature* **1995**, *375*, 772-774.
- [36] G. F. Joyce, *Nature* **2002**, *418*, 214-221.
- [37] G. F. Joyce, *Nature* **1989**, *338*, 217-224.
- [38] A. S. Spirin, *Molekuliarnaia biologii* **2005**, *39*, 550-556.
- [39] D. Lundin, G. Berggren, D. T. Logan, B. M. Sjoberg, *Life* **2015**, *5*, 604-636.
- [40] A. Kun, A. Szilagy, B. Konnyu, G. Boza, I. Zachar, E. Szathmary, *Annals of the New York Academy of Sciences* **2015**, *1341*, 75-95.
- [41] J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Nature* **1994**, *371*, 31-36.
- [42] T. R. Cech, O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1994**, *372*, 39-40.
- [43] C. Bohler, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578-581.
- [44] S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *Nature* **1998**, *396*, 447-450.
- [45] K. K. Sadhu, T. Eierhoff, W. Romer, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20013-20016.
- [46] T. N. Grossmann, A. Strohbach, O. Seitz, *Chembiochem* **2008**, *9*, 2185-2192.
- [47] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775-3789.
- [48] Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2013**, *52*, 4088-4106.
- [49] K. Sugimoto, M. Nishida, M. Otsuka, K. Makino, K. Ohkubo, Y. Mori, T. Morii, *Chem Biol* **2004**, *11*, 475-485.
- [50] A. Touthkine, V. Kraynov, K. Hahn, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 4132-4145.
- [51] R. M. de Lorimier, J. J. Smith, M. A. Dwyer, L. L. Looger, K. M. Sali, C. D. Paavola, S. S. Rizk, S. Sadigov, D. W. Conrad, L. Loew, H. W. Hellinga, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2002**, *11*, 2655-2675.

- [52] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nature reviews. Drug discovery* **2003**, *2*, 214-221.
- [53] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, F. F. Davis, *The Journal of biological chemistry* **1977**, *252*, 3582-3586.
- [54] A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *The Journal of biological chemistry* **1977**, *252*, 3578-3581.
- [55] F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discov Today* **2005**, *10*, 1451-1458.
- [56] G. J. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 5052-5053.
- [57] Y. A. Lin, J. M. Chalker, B. G. Davis, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 16805-16811.
- [58] K. Tanaka, T. Masuyama, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angewandte Chemie* **2008**, *47*, 102-105.
- [59] G. Elia, *Proteomics* **2008**, *8*, 4012-4024.
- [60] B. K. Shin, H. Wang, A. M. Yim, F. Le Naour, F. Brichory, J. H. Jang, R. Zhao, E. Puravs, J. Tra, C. W. Michael, D. E. Misek, S. M. Hanash, *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 7607-7616.
- [61] J. M. McFarland, M. B. Francis, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 13490-13491.
- [62] R. A. Scheck, M. B. Francis, *ACS Chem Biol* **2007**, *2*, 247-251.
- [63] T. Kodadek, I. Duroux-Richard, J. C. Bonnafous, *Trends Pharmacol Sci* **2005**, *26*, 210-217.
- [64] C. Denison, T. Kodadek, *Journal of proteome research* **2004**, *3*, 417-425.
- [65] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 3718-3723.
- [66] N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 15942-15943.
- [67] S. D. Tilley, M. B. Francis, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 1080-1081.
- [68] J. M. Antos, M. B. Francis, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 10256-10257.
- [69] J. M. Antos, J. M. McFarland, A. T. Iavarone, M. B. Francis, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 6301-6308.
- [70] M. Boyce, C. R. Bertozzi, *Nat Methods* **2011**, *8*, 638-642.
- [71] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2008**, *47*, 10030-10074.
- [72] T. Kurpiers, H. D. Mootz, *Angewandte Chemie* **2009**, *48*, 1729-1731.
- [73] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem Biol* **2014**, *9*, 592-605.
- [74] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
- [75] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [76] C. C. Liu, P. G. Schultz, in *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 79, Annual Reviews, Palo Alto, **2010**, pp. 413-444.

- [77] C. J. Noren, S. J. Anthonycahill, D. J. Suich, K. A. Noren, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 83-88.
- [78] M. G. Cull, P. J. Schatz, *Methods Enzymol* **2000**, *326*, 430-440.
- [79] J. E. Cronan, Jr., K. E. Reed, *Methods Enzymol* **2000**, *326*, 440-458.
- [80] I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, *Nat Methods* **2005**, *2*, 99-104.
- [81] M. Howarth, A. Y. Ting, *Nat Protoc* **2008**, *3*, 534-545.
- [82] C. Uttamapinant, K. A. White, H. Baruah, S. Thompson, M. Fernandez-Suarez, S. Puthenveetil, A. Y. Ting, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 10914-10919.
- [83] M. Fernandez-Suarez, H. Baruah, L. Martinez-Hernandez, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, A. Y. Ting, *Nat Biotechnol* **2007**, *25*, 1483-1487.
- [84] S. Puthenveetil, D. S. Liu, K. A. White, S. Thompson, A. Y. Ting, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 16430-16438.
- [85] T. Tanaka, T. Yamamoto, S. Tsukiji, T. Nagamune, *Chembiochem* **2008**, *9*, 802-807.
- [86] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 707-708.
- [87] J. M. Antos, G. L. Chew, C. P. Guimaraes, N. C. Yoder, G. M. Grotenbreg, M. W. Popp, H. L. Ploegh, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 10800-10801.
- [88] M. W. Popp, J. M. Antos, H. L. Ploegh, *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* **2009**, *Chapter 15*, Unit 15 13.
- [89] Z. Zhou, P. Cironi, A. J. Lin, Y. Xu, S. Hrvatin, D. E. Golan, P. A. Silver, C. T. Walsh, J. Yin, *ACS Chem Biol* **2007**, *2*, 337-346.
- [90] W. P. Heal, S. R. Wickramasinghe, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate, *Org Biomol Chem* **2008**, *6*, 2308-2315.
- [91] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.
- [92] A. Keppler, M. Kindermann, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Methods* **2004**, *32*, 437-444.
- [93] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128-136.
- [94] A. Gautier, E. Nakata, G. Lukinavicius, K. T. Tan, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17954-17962.
- [95] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohane, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373-382.
- [96] C. D. Hodneland, Y. S. Lee, D. H. Min, M. Mrksich, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 5048-5052.
- [97] C. S. Lisenbee, S. K. Karnik, R. N. Trelease, *Traffic* **2003**, *4*, 491-501.

- [98] A. E. Ruoho, H. Kiefer, P. E. Roeder, S. J. Singer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, *70*, 2567-2571.
- [99] M. H. Goeldner, J. E.; Casida, J. E. , *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 823-826.
- [100] P. E. H. Nielsen, J. B.; Thomsen, T.; Buchardt, O., *Experientia* **1983**, *39*, 1063-1072.
- [101] M. P. Goeldner, C. G. Hirth, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, *77*, 6439-6442.
- [102] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *The Journal of biological chemistry* **1980**, *255*, 3313-3318.
- [103] V. Chowdhry, R. Vaughan, F. H. Westheimer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1976**, *73*, 1406-1408.
- [104] R. A. Smith, J. R. Knowles, *J Am Chem Soc* **1973**, *95*, 5072-5073.
- [105] T. C. Turek, I. Gaon, D. Gamache, M. D. Distefano, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **1997**, *7*, 2125-2130.
- [106] L. J. Suva, M. S. Flannery, M. P. Caulfield, D. M. Findlay, H. Juppner, S. R. Goldring, M. Rosenblatt, M. Chorev, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1997**, *283*, 876-884.
- [107] K. Wright, A. Moretto, M. Crisma, M. Wakselman, J. P. Mazaleyrat, F. Formaggio, C. Toniolo, *Org Biomol Chem* **2010**, *8*, 3281-3286.
- [108] P. G. Campbell, T. L., *Photochemistry & Photobiology* **1979**, *29*, 883-892.
- [109] R. E. Galardy, L. C. Craig, M. P. Printz, *Nature: New biology* **1973**, *242*, 127-128.
- [110] D. M. Kolpashchikov, A. L. Zakharenko, S. V. Dezhurov, N. I. Rechkunova, S. N. Khodyreva, S. Degtiarev, V. V. Litvak, O. I. Lavrik, *Bioorganicheskaja khimiia* **1999**, *25*, 129-136.
- [111] M. J. T. P. Young, M. S. , *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2199-2202.
- [112] W. S. Stoffel, C.; Scheefers, H., *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* **1978**, *359*, 923-931.
- [113] G. W. J. P. Fleet, R. R.; Knowles, J. R. , *Nature* **1969**, *224*, 511-512.
- [114] V. Chowdhry, F. H. Westheimer, *Annu Rev Biochem* **1979**, *48*, 293-325.
- [115] J. Sumranjit, S. J. Chung, *Molecules* **2013**, *18*, 10425-10451.
- [116] E. L. Vodovozova, *Biochem.-Moscow* **2007**, *72*, 1-20.
- [117] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *The Journal of biological chemistry* **1962**, *237*, 3006-3008.
- [118] J. Das, *Chemical reviews* **2011**, *111*, 4405-4417.
- [119] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chemical reviews* **2006**, *106*, 3279-3301.
- [120] A. M. Sadaghiani, S. H. Verhelst, M. Bogyo, *Curr Opin Chem Biol* **2007**, *11*, 20-28.
- [121] K. Sakurai, S. Ozawa, R. Yamada, T. Yasui, S. Mizuno, *Chembiochem* **2014**, *15*, 1399-1403.
- [122] D. Robinette, N. Neamati, K. B. Tomer, C. H. Borchers, *Expert Rev Proteomic* **2006**, *3*, 399-408.
- [123] Z. Chen, C. Jing, S. S. Gallagher, M. P. Sheetz, V. W. Cornish, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 13692-13699.
- [124] M. Siegel, J. Xia, C. Khosla, *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 6253-6261.

- [125] H. Abe, R. Wakabayashi, H. Yonemura, S. Yamada, M. Goto, N. Kamiya, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 242-250.
- [126] B. Zakeri, M. Howarth, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 4526-4527.
- [127] B. Zakeri, J. O. Fierer, E. Celik, E. C. Chittock, U. Schwarz-Linek, V. T. Moy, M. Howarth, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, E690-697.
- [128] S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori, K. Kikuchi, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 5016-5017.
- [129] H. Nonaka, S. H. Fujishima, S. H. Uchinomiya, A. Ojida, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 9301-9309.
- [130] H. Nonaka, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 15777-15779.
- [131] Y. Lu, F. Huang, J. Wang, J. Xia, *Bioconjug Chem* **2014**, *25*, 989-999.
- [132] J. Wang, Y. Yu, J. Xia, *Bioconjug Chem* **2014**, *25*, 178-187.
- [133] B. V. Marquez, H. E. Beck, T. A. Aweda, B. Phinney, C. Holsclaw, W. Jewell, D. Tran, J. J. Day, M. N. Peiris, C. Nwosu, C. Lebrilla, C. F. Meares, *Bioconjug Chem* **2012**, *23*, 1080-1089.
- [134] Y. Takaoka, H. Tsutsumi, N. Kasagi, E. Nakata, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 3273-3280.
- [135] G. Chen, A. Heim, D. Riether, D. Yee, Y. Milgrom, M. A. Gawinowicz, D. Sames, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 8130-8133.
- [136] M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381-1386.
- [137] B. K. Park, A. Boobis, S. Clarke, C. E. P. Goldring, D. Jones, J. G. Kenna, C. Lambert, H. G. Laverty, D. J. Naisbitt, S. Nelson, D. A. Nicoll-Griffith, R. S. Obach, P. Routledge, D. A. Smith, D. J. Tweedie, N. Vermeulen, D. P. Williams, I. D. Wilson, T. A. Baillie, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 292-306.
- [138] T. Tamura, Y. Kioi, T. Miki, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 6782-6785.
- [139] S. Tsukiji, I. Hamachi, *Curr Opin Chem Biol* **2014**, *21*, 136-143.
- [140] S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 341-343.
- [141] H. J. Cho, H. Y. Gee, K. H. Baek, S. K. Ko, J. M. Park, H. Lee, N. D. Kim, M. G. Lee, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20267-20276.
- [142] M. Takahashi, A. Kawamura, N. Kato, T. Nishi, I. Hamachi, J. Ohkanda, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2012**, *51*, 509-512.
- [143] Y. Takaoka, Y. Sun, S. Tsukiji, I. Hamachi, *Chemical Science* **2011**, *2*, 511-520.
- [144] T. Tamura, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 2216-2226.
- [145] S. Tsukiji, H. Wang, M. Miyagawa, T. Tamura, Y. Takaoka, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 9046-9054.
- [146] S. H. Uchinomiya, H. Nonaka, S. H. Fujishima, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *Chem Commun (Camb)* **2009**, 5880-5882.
- [147] T. Masuya, M. Murai, K. Ifuku, H. Morisaka, H. Miyoshi, *Biochemistry* **2014**, *53*, 2307-2317.

- [148] C. Jing, V. W. Cornish, *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 1704-1712.
- [149] S. H. Fujishima, R. Yasui, T. Miki, A. Ojida, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 3961-3964.
- [150] K. K. Matsuo, Y.; Yasui, R.; Takaoka, Y.; Miki, T.; Fujishima, S. H.; Hamachi, I. , *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2573-2580.
- [151] T. Miki, S. H. Fujishima, K. Komatsu, K. Kuwata, S. Kiyonaka, I. Hamachi, *Chem Biol* **2014**, *21*, 1013-1022.
- [152] S. A. Alla, J. Buschko, U. Quitterer, A. Maidhof, M. Haasemann, G. Breipohl, J. Knolle, W. Muller-Esterl, *The Journal of biological chemistry* **1993**, *268*, 17277-17285.
- [153] Y. N. Takaoka, Y.; Hashimoto, Y.; Sasakia, K.; Hamachi, I., *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3217-3224.
- [154] C. C. Hughes, Y. L. Yang, W. T. Liu, P. C. Dorrestein, J. J. La Clair, W. Fenical, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 12094-12096.
- [155] Y. Koshi, E. Nakata, M. Miyagawa, S. Tsukiji, T. Ogawa, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 245-251.
- [156] H. Wang, Y. Koshi, D. Minato, H. Nonaka, S. Kiyonaka, Y. Mori, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 12220-12228.
- [157] Y. Sun, Y. Takaoka, S. Tsukiji, M. Narazaki, T. Matsuda, I. Hamachi, *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21*, 4393-4396.
- [158] U. Reinhardt, J. Lotze, S. Zernia, K. Morl, A. G. Beck-Sickinger, O. Seitz, *Angewandte Chemie* **2014**, *53*, 10237-10241.
- [159] P. G. Swann, R. A. Casanova, A. Desai, M. M. Frauenhoff, M. Urbancic, U. Slomczynska, A. J. Hopfinger, G. C. Le Breton, D. L. Venton, *Biopolymers* **1996**, *40*, 617-625.
- [160] S. G. Yao, I.; Zutshi, R.; Chmielewski, J., *Angewandte Chemie* **1998**, *37*, 478-481.
- [161] Z. Arany, W. R. Sellers, D. M. Livingston, R. Eckner, *Cell* **1994**, *77*, 799-800.
- [162] A. Giordano, M. L. Avantaggiati, *Journal of cellular physiology* **1999**, *181*, 218-230.
- [163] J. C. Chrivia, R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy, R. H. Goodman, *Nature* **1993**, *365*, 855-859.
- [164] A. M. Naar, B. D. Lemon, R. Tjian, *Annu Rev Biochem* **2001**, *70*, 475-501.
- [165] E. Kalkhoven, *Biochemical pharmacology* **2004**, *68*, 1145-1155.
- [166] C. W. Lee, M. Arai, M. A. Martinez-Yamout, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2115-2124.
- [167] K. J. McManus, M. J. Hendzel, *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **2001**, *79*, 253-266.
- [168] Y. Z. Shao, G.; Lu, J.; Huang, B., *Chinese Science Bulletin* **2004**, *49*, 2555-2562.
- [169] A. L. Kung, V. I. Rebel, R. T. Bronson, L. E. Ch'ng, C. A. Sieff, D. M. Livingston, T. P. Yao, *Genes Dev* **2000**, *14*, 272-277.

- [170] G. A. Blobel, *Journal of leukocyte biology* **2002**, *71*, 545-556.
- [171] R. G. McArthur, *Canadian Medical Association journal* **1967**, *96*, 462-466.
- [172] F. Petrij, R. H. Giles, H. G. Dauwerse, J. J. Saris, R. C. Hennekam, M. Masuno, N. Tommerup, G. J. van Ommen, R. H. Goodman, D. J. Peters, et al., *Nature* **1995**, *376*, 348-351.
- [173] R. Janknecht, *Histology and histopathology* **2002**, *17*, 657-668.
- [174] H. M. Chan, N. B. La Thangue, *Journal of cell science* **2001**, *114*, 2363-2373.
- [175] A. Toto, R. Giri, M. Brunori, S. Gianni, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2014**, *23*, 962-969.
- [176] J. K. A. Thakur, P.; Parida, S.; Bajaj, D.; Pasrija, R., *Mol Genet Genomics* **2013**, *288*, 329-346.
- [177] S. Bruchweiler, R. Konrat, M. Tollinger, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1600-1610.
- [178] V. M. Dadarlat, R. D. Skeel, *Biophys J* **2011**, *100*, 469-477.
- [179] I. Radhakrishnan, G. C. Perez-Alvarado, D. Parker, H. J. Dyson, M. R. Montminy, P. E. Wright, *Cell* **1997**, *91*, 741-752.
- [180] R. H. Giles, D. J. Peters, M. H. Breuning, *Trends in genetics : TIG* **1998**, *14*, 178-183.
- [181] R. H. Goodman, S. Smolik, *Genes Dev* **2000**, *14*, 1553-1577.
- [182] R. N. De Guzman, N. K. Goto, H. J. Dyson, P. E. Wright, *J Mol Biol* **2006**, *355*, 1005-1013.
- [183] W. C. Pomerantz, N. Wang, A. K. Lipinski, R. Wang, T. Cierpicki, A. K. Mapp, *ACS Chem Biol* **2012**, *7*, 1345-1350.
- [184] N. K. Goto, T. Zor, M. Martinez-Yamout, H. J. Dyson, P. E. Wright, *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 43168-43174.
- [185] P. Ernst, J. Wang, M. Huang, R. H. Goodman, S. J. Korsmeyer, *Mol Cell Biol* **2001**, *21*, 2249-2258.
- [186] M. Arai, H. J. Dyson, P. E. Wright, *FEBS Lett* **2010**, *584*, 4500-4504.
- [187] E. N. Korkmaz, R. Nussinov, T. Haliloglu, *PLoS computational biology* **2012**, *8*, e1002420.
- [188] D. Parker, U. S. Jhala, I. Radhakrishnan, M. B. Yaffe, C. Reyes, A. I. Shulman, L. C. Cantley, P. E. Wright, M. Montminy, *Mol Cell* **1998**, *2*, 353-359.
- [189] D. Parker, M. Rivera, T. Zor, A. Henrion-Caude, I. Radhakrishnan, A. Kumar, L. H. Shapiro, P. E. Wright, M. Montminy, P. K. Brindle, *Mol Cell Biol* **1999**, *19*, 5601-5607.
- [190] Y. P. Liu, C. W. Chang, K. Y. Chang, *FEBS Lett* **2003**, *554*, 403-409.
- [191] R. K. Slany, *Haematologica* **2009**, *94*, 984-993.
- [192] R. Popovic, N. J. Zeleznik-Le, *Journal of cellular biochemistry* **2005**, *95*, 234-242.
- [193] S. Ziemer-van der Poel, N. R. McCabe, H. J. Gill, R. Espinosa, 3rd, Y. Patel, A. Harden, P. Rubinelli, S. D. Smith, M. M. LeBeau, J. D. Rowley, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 10735-10739.

- [194] M. Piskacek, A. Vasku, R. Hajek, A. Knight, *Mol Biosyst* **2015**, *11*, 844-851.
- [195] R. N. De Guzman, N. K. Goto, H. J. Dyson, P. E. Wright, *J. Mol. Biol* **2006**, *355*, 1005-1013.
- [196] J. M. Kornhauser, C. W. Cowan, A. J. Shaywitz, R. E. Dolmetsch, E. C. Griffith, L. S. Hu, C. Haddad, Z. Xia, M. E. Greenberg, *Neuron* **2002**, *34*, 221-233.
- [197] A. J. Silva, J. H. Kogan, P. W. Frankland, S. Kida, *Annual review of neuroscience* **1998**, *21*, 127-148.
- [198] R. Bourtchuladze, B. Frenguelli, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz, A. J. Silva, *Cell* **1994**, *79*, 59-68.
- [199] A. E. West, E. C. Griffith, M. E. Greenberg, *Nature reviews. Neuroscience* **2002**, *3*, 921-931.
- [200] H. A. Giebler, I. Lemasson, J. K. Nyborg, *Mol Cell Biol* **2000**, *20*, 4849-4858.
- [201] B. E. Lonze, D. D. Ginty, *Neuron* **2002**, *35*, 605-623.
- [202] M. R. Montminy, L. M. Bilezikjian, *Nature* **1987**, *328*, 175-178.
- [203] A. Chhabra, H. Fernando, G. Watkins, R. E. Mansel, W. G. Jiang, *Oncology reports* **2007**, *18*, 953-958.
- [204] H. S. Seo, D. D. Liu, B. N. Bekele, M. K. Kim, K. Pisters, S. M. Lippman, Wistuba, II, J. S. Koo, *Cancer Res* **2008**, *68*, 6065-6073.
- [205] D. B. Shankar, J. C. Cheng, K. Kinjo, N. Federman, T. B. Moore, A. Gill, N. P. Rao, E. M. Landaw, K. M. Sakamoto, *Cancer Cell* **2005**, *7*, 351-362.
- [206] A. J. Shaywitz, M. E. Greenberg, *Annu Rev Biochem* **1999**, *68*, 821-861.
- [207] D. Wu, H. E. Zhau, W. C. Huang, S. Iqbal, F. K. Habib, O. Sartor, L. Cvitanovic, F. F. Marshall, Z. Xu, L. W. Chung, *Oncogene* **2007**, *26*, 5070-5077.
- [208] B. X. Li, X. Xiao, *Chembiochem* **2009**, *10*, 2721-2724.
- [209] M. Johannessen, M. P. Delghandi, U. Moens, *Cellular signalling* **2004**, *16*, 1211-1227.
- [210] M. Sheng, M. A. Thompson, M. E. Greenberg, *Science* **1991**, *252*, 1427-1430.
- [211] M. R. Montminy, G. A. Gonzalez, K. K. Yamamoto, *Trends in neurosciences* **1990**, *13*, 184-188.
- [212] G. A. Gonzalez, M. R. Montminy, *Cell* **1989**, *59*, 675-680.
- [213] D. Ganguly, J. Chen, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 5214-5223.
- [214] D. Parker, K. Ferreri, T. Nakajima, V. J. LaMorte, R. Evans, S. C. Koerber, C. Hoeger, M. R. Montminy, *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, 694-703.
- [215] I. Radhakrishnan, G. C. Perez-Alvarado, H. J. Dyson, P. E. Wright, *FEBS Lett* **1998**, *430*, 317-322.
- [216] A. L. Fink, *Curr Opin Struct Biol* **2005**, *15*, 35-41.
- [217] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2005**, *6*, 197-208.
- [218] L. M. Iakoucheva, C. J. Brown, J. D. Lawson, Z. Obradovic, A. K. Dunker, *J Mol Biol* **2002**, *323*, 573-584.

- [219] A. K. Dunker, C. J. Brown, J. D. Lawson, L. M. Iakoucheva, Z. Obradovic, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6573-6582.
- [220] P. E. Wright, H. J. Dyson, *J Mol Biol* **1999**, *293*, 321-331.
- [221] K. Sugase, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nature* **2007**, *447*, 1021-1025.
- [222] J. J. Ward, J. S. Sodhi, L. J. McGuffin, B. F. Buxton, D. T. Jones, *J Mol Biol* **2004**, *337*, 635-645.
- [223] S. L. Shammass, A. J. Travis, J. Clarke, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 12055-12060.
- [224] M. Montminy, *Annu Rev Biochem* **1997**, *66*, 807-822.
- [225] D. Eliezer, A. G. Palmer, 3rd, *Nature* **2007**, *447*, 920-921.
- [226] T. Zor, R. N. De Guzman, H. J. Dyson, P. E. Wright, *J. Mol. Biol* **2004**, *337*, 521-534.
- [227] R. Eckner, *Biol Chem* **1996**, *377*, 685-688.
- [228] K. M. Campbell, K. J. Lumb, *Biochemistry* **2002**, *41*, 13956-13964.
- [229] A. C. Vendel, K. J. Lumb, *Biochemistry* **2003**, *42*, 910-916.
- [230] F. Baneyx, *Curr Opin Biotechnol* **1999**, *10*, 411-421.
- [231] J. Hodgson, *Bio/technology* **1993**, *11*, 887-893.
- [232] L. Gold, *Methods Enzymol* **1990**, *185*, 11-14.
- [233] G. Georgiou, P. Valax, *Curr Opin Biotechnol* **1996**, *7*, 190-197.
- [234] S. C. Makrides, *Microbiological reviews* **1996**, *60*, 512-538.
- [235] M. S. Kuriyama, J.-I.; Nakatu, M.; Kurokawa, T.; Sawada, H., *J. Ferment. Bioeng.* **1995**, *80*, 327-333.
- [236] G. Hannig, S. C. Makrides, *Trends Biotechnol* **1998**, *16*, 54-60.
- [237] M. J. Weickert, D. H. Doherty, E. A. Best, P. O. Olins, *Curr Opin Biotechnol* **1996**, *7*, 494-499.
- [238] R. C. Stevens, *Structure* **2000**, *8*, R177-185.
- [239] N. Mertens, E. Remaut, W. Fiers, *Gene* **1995**, *164*, 9-15.
- [240] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J Mol Biol* **1986**, *189*, 113-130.
- [241] R. M. Morgan-Kiss, C. Wadler, J. E. Cronan, Jr., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 7373-7377.
- [242] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff, *Methods Enzymol* **1990**, *185*, 60-89.
- [243] J. W. Dubendorff, F. W. Studier, *J Mol Biol* **1991**, *219*, 45-59.
- [244] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, J. Beckwith, *J Bacteriol* **1995**, *177*, 4121-4130.
- [245] H. P. Sorensen, K. K. Mortensen, *J Biotechnol* **2005**, *115*, 113-128.

- [246] G. del Solar, R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarria, M. Espinosa, R. Diaz-Orejas, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **1998**, *62*, 434-464.
- [247] Y. P. Shih, W. M. Kung, J. C. Chen, C. H. Yeh, A. H. Wang, T. F. Wang, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2002**, *11*, 1714-1719.
- [248] M. Hammarstrom, N. Hellgren, S. van Den Berg, H. Berglund, T. Hard, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2002**, *11*, 313-321.
- [249] T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 6723-6730.
- [250] T. Zor, B. M. Mayr, H. J. Dyson, M. R. Montminy, P. E. Wright, *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 42241-42248.
- [251] D. J. Mandell, I. Chorny, E. S. Groban, S. E. Wong, E. Levine, C. S. Rapp, M. P. Jacobson, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 820-827.
- [252] A. J. Shaywitz, S. L. Dove, J. M. Kornhauser, A. Hochschild, M. E. Greenberg, *Mol Cell Biol* **2000**, *20*, 9409-9422.
- [253] D. S. Wilbur, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 433-470.
- [254] L. Polgar, P. Halasz, *European journal of biochemistry / FEBS* **1973**, *39*, 421-429.
- [255] E. B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P. R. Selvin, *Anal. Biochem.* **1999**, *273*, 73-80.
- [256] D. J. Cline, S. E. Redding, S. G. Brohawn, J. N. Psathas, J. P. Schneider, C. Thorpe, *Biochemistry* **2004**, *43*, 15195-15203.
- [257] F. Ritossa, *Experientia* **1962**, *18*, 571-573.
- [258] A. F. Laplante, V. Moulin, F. A. Auger, J. Landry, H. Li, G. Morrow, R. M. Tanguay, L. Germain, *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **1998**, *46*, 1291-1301.
- [259] Y. O. Cao, N.; Matsumoto, T.; Kosaka, M.; Ohtsuru, A.; Yamashita, S., *Pflugers Arch.* **1999**, *438*, 239-244.
- [260] J. M. Matz, M. J. Blake, H. M. Tatelman, K. P. Lavoie, N. J. Holbrook, *The American journal of physiology* **1995**, *269*, R38-47.
- [261] T. W. Gong, D. A. Fairfield, L. Fullarton, D. F. Dolan, R. A. Altschuler, D. C. Kohrman, M. I. Lomax, *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* **2012**, *13*, 29-37.
- [262] A. De Maio, *Shock* **1999**, *11*, 1-12.
- [263] J. G. Kiang, G. C. Tsokos, *Pharmacology & therapeutics* **1998**, *80*, 183-201.
- [264] U. Feige, B. S. Polla, *Experientia* **1994**, *50*, 979-986.
- [265] E. Dulin, P. Garcia-Barreno, M. C. Guisasola, *Cell stress & chaperones* **2010**, *15*, 929-937.
- [266] X. C. Gao, C. J. Zhou, Z. R. Zhou, M. Wu, C. Y. Cao, H. Y. Hu, *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287*, 6044-6052.

- [267] R. Kityk, J. Kopp, I. Sinning, M. P. Mayer, *Mol Cell* **2012**, *48*, 863-874.
- [268] F. H. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R. J. Watts-Tobin, *Nature* **1961**, *192*, 1227-1232.
- [269] F. H. Crick, *J Mol Biol* **1966**, *19*, 548-555.
- [270] H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13980-13986.
- [271] C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, *45*, 5369-5373.
- [272] T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15596-15597.
- [273] S. S. J. Panda, R. A.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R, *Top Curr Chem* **2014**.
- [274] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 923-960.
- [275] T. N. Grossmann, L. Roglin, O. Seitz, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2008**, *47*, 7119-7122.
- [276] S. J. Gould, S. Subramani, *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 5-13.
- [277] T. V. Mašek, V.; Pospíšek, M., *Cent. Eur. J. Biol.* **2013**, *8*, 423-431.
- [278] M. Hattori, T. Ozawa, *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* **2014**, *30*, 539-544.
- [279] T. Azad, A. Tashakor, S. Hosseinkhani, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2014**, *406*, 5541-5560.
- [280] R. B. Kapust, J. Tozser, T. D. Copeland, D. S. Waugh, *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, *294*, 949-955.
- [281] H. M. Bandara, S. C. Burdette, *Chemical Society reviews* **2012**, *41*, 1809-1825.
- [282] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chemical Society reviews* **2011**, *40*, 4422-4437.
- [283] L. N. Lorenz, K.; Kusebauch, U.; Moroder, L.; Wachtveitl, J., *Springer Series in Chemical Physics* **2009**, *92*, 583-585.
- [284] D. S. Waugh, *Protein expression and purification* **2011**, *80*, 283-293.
- [285] T. Korzybski, *Postepy biochemii* **1962**, *8*, 261-293.
- [286] R. J. Roberts, M. Belfort, T. Bestor, A. S. Bhagwat, T. A. Bickle, J. Bitinaite, R. M. Blumenthal, S. Degtyarev, D. T. Dryden, K. Dybvig, K. Firman, E. S. Gromova, R. I. Gumpport, S. E. Halford, S. Hattman, J. Heitman, D. P. Hornby, A. Janulaitis, A. Jeltsch, J. Josephsen, A. Kiss, T. R. Klaenhammer, I. Kobayashi, H. Kong, D. H. Kruger, S. Lacks, M. G. Marinus, M. Miyahara, R. D. Morgan, N. E. Murray, V. Nagaraja, A. Piekarowicz, A. Pingoud, E. Raleigh, D. N. Rao, N. Reich, V. E. Repin, E. U. Selker, P. C. Shaw, D. C. Stein, B. L. Stoddard, W. Szybalski, T. A. Trautner, J. L. Van Etten, J. M. Vitor, G. G. Wilson, S. Y. Xu, *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 1805-1812.
- [287] F. Z. Lottspeich, H., *Spektrum Akademischer Verlag* **1998**.
- [288] J. V. Maizel, *Trends Biochem Sci* **2000**, *25*, 590-592.
- [289] S. R. Gallagher, *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* **2006**, Chapter 10, Unit 10 12A.

- [290] J. Sasse, S. R. Gallagher, *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* **2004**, Chapter 8, Unit 8 9.
- [291] W. N. Burnette, *Anal Biochem* **1981**, *112*, 195-203.
- [292] J. Renart, J. Reiser, G. R. Stark, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76*, 3116-3120.
- [293] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *Biotechnology* **1992**, *24*, 145-149.
- [294] R. S. Yalow, S. A. Berson, *The Journal of clinical investigation* **1960**, *39*, 1157-1175.
- [295] R. M. Lequin, *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2415-2418.
- [296] D. H. A. R. Corrêa, C. H. I., *AJBR* **2009**, *3*, 164-173.
- [297] J. D. Hirst, C. L. Brooks, 3rd, *J Mol Biol* **1994**, *243*, 173-178.
- [298] G. Bohm, R. Muhr, R. Jaenicke, *Protein Eng* **1992**, *5*, 191-195.
- [299] W. J. Checovich, R. E. Bolger, T. Burke, *Nature* **1995**, *375*, 254-256.
- [300] D. M. Jameson, J. A. Ross, *Chemical reviews* **2010**, *110*, 2685-2708.
- [301] F. Perrin, *J. Phys. Radium* **1926**, *7*, 390-401.
- [302] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- [303] J. B. Fenn, *Journal of biomolecular techniques : JBT* **2002**, *13*, 101-118.
- [304] H. W. Beyer, W., *Hirzel Verlag* **1998**, *23*.
- [305] E. R. Andrew, *Brain topography* **1992**, *5*, 129-133.
- [306] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *The Journal of organic chemistry* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [307] M. M. Bradford, *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-254.
- [308] W. F. Patton, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1123-1144.
- [309] U. Varshney, U. L. RajBhandary, *J Bacteriol* **1992**, *174*, 7819-7826.
- [310] F. Sherman, J. W. Stewart, S. Tsunasawa, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **1985**, *3*, 27-31.
- [311] H. U. Petersen, E. Joseph, A. Ullmann, A. Danchin, *J Bacteriol* **1978**, *135*, 453-459.
- [312] U. Lagerkvist, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, *75*, 1759-1762.
- [313] B. T. Watson JD, Bell SP, Gann A, Levine M, Oosick R. (2008). *Molecular Biology of the Gene*. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings. ISBN 0-8053-9592-X.
- [314] P. Stothard, *Biotechniques* **2000**, *28*, 1102, 1104.
- [315] K. B. Mullis, F. A. Faloona, *Methods Enzymol* **1987**, *155*, 335-350.
- [316] H. C. Birnboim, J. Doly, *Nucleic Acids Res* **1979**, *7*, 1513-1523.

- [317] C. A. Hutchison, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *Journal of Biological Chemistry* **1978**, *253*, 6551-6560.
- [318] J. D. Oliner, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*, 5192-5197.
- [319] C. Aslanidis, P. J. de Jong, *Nucleic Acids Res* **1990**, *18*, 6069-6074.
- [320] M. Dagert, S. D. Ehrlich, *Gene* **1979**, *6*, 23-28.
- [321] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, *Gene* **1990**, *96*, 23-28.
- [322] D. Hanahan, *J Mol Biol* **1983**, *166*, 557-580.
- [323] C. Mülhardt, *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*, 7 ed., Springer Spektrum, **2013**.
- [324] J. Phan, A. Zdanov, A. G. Evdokimov, J. E. Tropea, H. K. Peters, 3rd, R. B. Kapust, M. Li, A. Wlodawer, D. S. Waugh, *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 50564-50572.
- [325] J. M. Goldberg, S. Batjargal, B. S. Chen, E. J. Petersson, *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 18651-18658.
- [326] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach*, Oxford University Press, New York, **2000**.
- [327] G. M. Dubowchik, S. Radia, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5257-5260.
- [328] J. Coste, D. Lenguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [329] E. Frerot, J. Coste, A. Pantaloni, M. N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259-270.
- [330] T. Hoegjensen, M. H. Jakobsen, A. Holm, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6387-6390.
- [331] S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [332] B. G. de La Torre, D. Andreu, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2008**, *14*, 360-363.
- [333] M. Boudart, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 661-666.
- [334] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios, H. Stockinger, *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, W597-603.

8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tom N. Grossmann für die Überlassung des vielschichtigen und faszinierenden Themas, den gewährten wissenschaftlichen Freiraum und das in mich gesetzte Vertrauen. Seine fortlaufende Unterstützung und konstruktiven Anregungen waren für mich von ganz besonderem Wert. Tom, Ich bin stolz, dein erster Doktorand gewesen sein zu dürfen und hatte viel Spaß dabei, ein Teil deiner Arbeitsgruppe zu sein und zu dessen Entwicklung beigetragen zu haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Erstprüfers sowie die Möglichkeit, von der gesamten Infrastruktur der Abteilung IV des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie profitieren zu dürfen.

Der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der chemischen Industrie e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines zweijährigen Promotionsstipendiums.

Bei Laura Dietrich, Galina Brauckhoff, Kathrin Friedmann, Dennis Arndt und Jochen Hartung bedanke ich mich für die zügigen und kritischen Erstkorrekturen dieses Manuskripts.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das lustige und unbeschwerte Arbeitsklima und vor allen Dingen für die Tradition des Harry-Belafonte-Freitags. Herrn Dr. Gernot Hahne danke ich für seine Unterstützung innerhalb der molekularbiologischen Arbeiten und seine hilfreichen Anregungen in zahlreichen Diskussionen. Frau Dr. Marta Pelay Gimeno danke ich für die Hilfestellungen und ihre Expertise innerhalb der chemischen Synthese und der NMR-Analysen.

Besonders danke ich Herrn Adrian Glas, Frau Laura Dietrich und Frau Nicole Meißner. Durch euch habe ich neben tollen Arbeitskollegen drei Freunde gewonnen.

Frau Dr. Petra Janning danke ich für die Möglichkeit, auf ihre tiefgreifenden Sachkenntnisse und langjährige Erfahrung in Bezug auf massenspektroskopische Systeme zurückgreifen zu dürfen.

Herrn Sascha Gentz möchte ich für seine Hilfe innerhalb der automatisierten Festphasensynthese von Peptiden danken.

Sämtlichen Arbeitsgruppen des *Chemical Genomics Centres* sowie der gesamten Abteilung IV des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie danke ich für ein freundschaftliches Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mir meine akademische Ausbildung ermöglichten und stets an mich glauben.

Ich bedanke mich weiterhin bei meiner geliebten Schwester Kathrin und meinen wunderbaren Schwiegereltern für die große und wichtige Unterstützung. Meinen Freunden Dennis, Jochen, Wladimir und Alexander möchte ich dafür danken, dass es sie gibt und sie mir seit Jahrzehnten zur Seite stehen.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Galina und meinem Sohn Jan. Ihr seid der Grund, warum ich stets nach dem Besten strebe. Danke Galina, dass du mir eine starke Stütze und eine unglaubliche Ehefrau bist, die nie an mir zweifelt. Danke Jan, dass du mir immer wieder zeigst, wie wichtig der Moment ist und dass nach getaner Arbeit eine Familie auf mich wartet. Du hast an dem Erfolg dieser Arbeit mehr Anteil, als du es im Moment ahnen kannst.

Danke!

9 Anhang

9.1 Primersequenzen

Tabelle 34: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer P01 – P19.

Primer Nr.	Sequenz	Länge
P01	gcgaaattaatacgaactcactataggg	27 bp
P02	ggatatagttcctcctttcagcaaaaaaccc	31 bp
P03	gcgccatgggtgtaaggaaaggctggcac	29 bp
P04	gcgctcgagtcaacgcgacctccgtttttcttc	33 bp
P05	gtgcctggatgcgttcccaaaatt	24 bp
P06	cacccgctgacgcgccctgacggg	24 bp
P07	ctttaagaaggagatataccatgtgcatgacggcaacattctgccg	47 bp
P08	cggcagaatggtgccgtcatcgcacatggtatatctccttcttaaag	47 bp
P09	ctttaagaaggagatataccatggccaaagccgcgatcg	41 bp
P10	ggtaggtggtggtgctcgagcgggccctgaaacagcaacttccagatctacctcct caatggtggggcc	67 bp
P11	cctgacgatcgacgacggcatcttcg	26 bp
P12	gggttggttgtcggagtaggtgg	23 bp
P13	ggaaaacctttattttcagggcgccatggccaaagccgcgatcgg	48 bp
P14	gaaggagatataccatggccgatgacggcaacattc	36 bp
P15	gaatggtgccgtcatcgccatggtatatctccttc	36 bp
P16	cctggtgccgcgcgccagccatatggaagatgccaaaaacattaagaagggcc	53 bp
P17	gtggtggtggtggtggtgctcgagtcattacggcgatcttgccgcc	49 bp
P18	taatacgaactcactataggg	20 bp
P19	ccgctgagcaataactagc	19 bp

9.2 gBlock-Sequenzen

Bei einem gBlock handelt es sich um einen doppelsträngigen DNA-Strang gewünschter Sequenz, der von der Firma IDT individuell hergestellt wird. Die Länge der DNA-Sequenz darf dabei, laut Firma, zwischen 125 und 2000 Basenpaare betragen.

gB1 129 bp

```
cgagttcgggatcgcccatgggcgatgacggcaacattctgccgtccgatattatggatthttgtgctgaaaaaca  
ccccgtcctgggaaaacctttatthttcagggcgccatggcgcgctaggtacatg
```

gB2 189 bp

```
cgctatcgctatctcgagccggcgthttgatggccagaaccggatgaaggcaacgcggaaaacctgtatthttcag  
ggcatgtgcgatgacggcaacattctgccgtccgatattatggatthttgtgctgaaaaacacccccgtcctggctg  
gaagtgtctgthttcagggcccgctcgagctaggtcatgac
```

gB3 189 bp

```
cgctatcgctatctcgagccggcgthttgatggccagaaccggatgaaggcaacgcggaaaacctgtatthttcag  
ggcatggcggatgacggcaacattctgccgtccgatattatggatthttgtgctgaaaaacacccccgtcctggctg  
gaagtgtctgthttcagggcccgctcgagctaggtcatgac
```

gB4 815 bp

```
gtttaactttaagaaggagatataccatgggcgatgtcccctatactaggttattggaaaattaagggccttgctgc  
aaccactcgacttctthttggaatatcttgaagaaaaatatgaagagcatttgatgagcgcgatgaaggtgata  
aatggcgaaaacaaaaagthttgaattgggthttggagthttcccaatcttcttattatattgatgggtgatgttaa  
taacacagtctatggccatcatacgttatatagctgacaagcacaacatgthttgggtgthttgtccaaaagagcgtg  
cagagatthtcaatgcttgaaggagcggthttggatattagatacggthttcgagaattgcatatagtaaagact  
ttgaaactctcaaagthttgattthttcttagcaagctacctgaaatgctgaaaatgthttcgaagatcgtthttatg  
cataaaacatthttaaatgggtgatcatgtaaccatcctgacttcatgthttgatgacgctcttgatgthttttataca  
tggaccaatgthttgctggatgctgthttccaaaattagthttgthtttaaaaaacgtatthttgaagctatcccaca  
aattgataaagtactthttgaaatccagcaagtatatagcatggcctthttgcagggctggcaagccacgthttggtg  
gtggcgaccatcctccaaaatcggatgaaaacctgtatthttcagtgccggcaacattctgccgtccgatattatgg  
atthttgtgctgaaaaacacctggaagthttctgthttccaggggcccatatggctagcatgactgthttggacagcaa
```

gB5 820 bp

```
gtttaactttaagaaggagatataccatgtcccctatactaggttattggaaaattaagggccttgthttgcaacca  
ctcgacttctthttggaatatcttgaagaaaaatatgaagagcatttgatgagcgcgatgaaggtgataaatggc  
gaaacaaaaagthttgaattgggthttggagthttcccaatcttcttattatattgatgggtgatgttaaattaac  
acagtctatggccatcatacgttatatagctgacaagcacaacatgthttgggtgthttgtccaaaagagcgtgca  
gagatthtcaatgcttgaaggagcggthttggatattagatacggthttcgagaattgcatatagtaaagacttht  
gaaactctcaaagthttgattthttcttagcaagctacctgaaatgctgaaaatgthttcgaagatcgtthttatg  
cataaaacatthttaaatgggtgatcatgtaaccatcctgacttcatgthttgatgacgctcttgatgthttttata  
catggaccatgthttgctggatgctgthttccaaaattagthttgthtttaaaaaacgtatthttgaagctatccc  
acaattgataaagtactthttgaaatccagcaagtatatagcatggcctthttgcagggctggcaagccacgthttg  
gtgthttggcgaccatcctc
```

caaaatcggatgaaaacctgtatccccagggccgcaacattctgccgtccgatattatggatccccgtgctgaaaa
acaccctggaagttctgttccaggggccccataggaagatgccccaaaacattaagaagggccagcgcc

9.3 Gensequenzen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Gensequenzen explizit aufgeführt:

***kix* (kodiert für das Proteintemplat T) 258 bp**

gggtgaaggaaaggctggcacgaacatgtcactcaggacctgaggagccatctagtgcataaactcgtccaagcc
atcttccccaacacctgatccccgcagctctaaaggatcgccgatggaaaacctggtagcctatgctaagaaagtg
gaaggggacatgtacgagtctgccaacagcagggatgaatattatcacttatttagcagagaaaaatctacaagata
caaaaagaactagaagaaaaacggaggctcgct

***b* (kodiert für das Peptid B) 63 bp**

gatgacggcaacattctgccgtccgatattatggatccccgtgctgaaaaacacccccgtcctgg

***hsp* (kodiert für das Protein HSP) 1923 bp**

atggccaaagccgcccgatcggcatcgacctgggcaccacctactcctgcgtgggggtgttccaacacggcaag
gtggagatcatcgccaacgaccagggcaaccgcaaccacccccagctacgtggccttcacggacaccgagcggctc
atccgggatgcccgaagaaccaggtggcgtgaacccgcagaacaccgtgtttgacgcaagcggctgatccggc
cgcaagttcggcgaccgggtggtgcagtcggacatgaagcactggcctttccaggtgatcaacgacggagacaag
cccaaggtgcaggtgagctacaagggggacaccaaggcattctacccccaggagatctcgtccatgggtgctgacc
aagatgaaggagatcgccgagggctacctgggctacccggtagccaacgcggtagcaccgtgcccggcctacttc
aacgactcgcagcggccaggccaccaaggatgcccgggtgatcgccgggctcaacgtgctgaggatcatcaacgag
cccacggccgcgcgatcgcctacggcctggacagaacgggcaagggggagcgcgaacgtgctcatctttgacctg
ggcggggggcaccttcgacgtgtccatcctgacgatcgacgacggcatcttcgaggtgaaggccacggccgggggac
accacctgggtggggaggactttgacaacaggctggtagaaccttcgtggaggagtcaagagaaaacacaag
aaggacatcagccagaacaagcagcggctgaggcggctgcgacccgctgagagaggccaagaggaccctgtcg
tccagcaccagggccagcctggagatcgactccctgtttgagggcatcgacttctacagctccatcaccagggcg
aggttcgaggagctgtgctccgacctgttccgaagcaccctggagcccgtggagaaggctctgcgcgacgccaag
ctggacaaggccagatcaccgacctggtcctggtcgggggctccacccgcatccccaaagggtgcagaagctgctg
caggacttctcaacgggcgcgacctgaacaagagcatcaaccccgacgaggctgtggcctacggggcggcgggtg
caggcggccatcctgatgggggacaagtcggagaacgtgcaggacctgctgctgctggacgtggctcccctgtcg
ctggggctggagacggccggaggcgtgatgactgccctgatcaagcgaactccaccatccccaccaagcagacg
cagatcttaccacctactccgacaaccaacccgggggtgctgatccagggtgtacgagggcgagagggccatgacg
aaagacaacaatctgttggggcgttcgagctgagcggcatccctccggccccagggcgctgcccagatcgag
gtgaccttcgacatcgatgccaacggcatcctgaacgtcacggccacggacaagagcaccggcaaggccaacaag
atcaccatcaccacgacaagggccgctgagcaaggaggagatcgagcgcaggtgagaggggcgagaagtac
aaagcggaggacgaggtgcagcgcgagaggggtgtagccaagaacgcccctggagtcctacgccttcaacatgaag
agcgcgctggaggatgaggggtcaagggcaagatcagcagggcggacaagaagaaggttctggacaagtgtcaa
gaggtcatctcgtggctggacgccaacaccttggccgagaaggacgagtttgagcacaagaggaaggagctggag
cagggtgtgtaacccatcatcagcggactgtaccaggggtccgggtgggtcccgggctgggggcttcggggctcag
ggccccaaaggagggtctgggtcaggccccaccattgaggaggtagat

***luc* (Kodiert für das Protein Luc) 1650 bp**

```

atggaagatgccccaaacattaagaagggcccagcgcattctaccactcgaagacgggaccgcccggcgagcag
ctgcacaaagccatgaagcgtacgccctgggtgcccggcaccatcgcccttaccgacgcacatatcgaggtggac
attacctacgccgagtagtacttcgagatgagcgttcggctggcagaagctatgaagcgtatgggctgaatacaaac
catcggatcgtgggtgtgcagcagagaatagcttgcaagttcttcatgcccgtgttgggtgccctgttcatcgggtg
gctgtggccccagctaacgacatctacaacgagcgcgagctgctgaacagcatgggcatcagccagcccaccgctc
gtattcgtgagcaagaaagggctgcaaaagatcctcaacgtgcaaaagaagctaccgatcatacaaaagatcctc
atcatggatagcaagaccgactaccagggcttccaaagcatgtacaccttcgtgacttcccatttgccaccggc
ttcaacgagtagcacttcgtgcccagagcttcgaccgggacaaaaccatcgccctgatcatgaacagtagtggc
agtaccggattgcccgaagggcgtagccctaccgcaccgcaccgcttgtgtccgattcagtcatgcccgcgacccc
atcttcggcaaccagatcatccccgacaccgctatcctcagcgtggtgccatttcaccacggcttcggcatgttc
accacgctgggctacttgatctgcccgttttcgggtcgtgctcatgtaccgcttcgaggaggagctattcttgccg
agcttgcaagactataagattcaatctgccctgctgggtgccacactatttagcttcttcgtaagagcactctc
atcgacaagtagcactaagcaacttgcaagcagatcgccagcggcgggcgccgctcagcaaggaggtaggtagg
gccgtggccaaacgcttccacctaccaggcatccgccagggctacggcctgacagaaacaaccagcgcattctg
atccccccgaaggggacgacaagcctggcgcagtaggcaaggtgggtgcccttcttcgaggctaaggtgggtggac
ttggacaccggtaagacactgggtgtgaaccagcgcggcgagctgtgctccgtggccccatgatcatgagcggc
tacgttaacaacccccgaggctacaaacgctctcatcgacaaggacggctggctgcacagcggcgacatcgcctac
tgggacgaggacgagcacttcttcatcgtggaccggctgaagagcctgatcaatacaagggctaccaggtagcc
ccagccgaactggagagatcctgctgcaacaccccacatcttcgacgccggggctcgccggcctgcccgacgac
gatgcccggcgagctgcccgcgcagtcgtcgtgctggaacacggtaaaacatgaccgagaaggagatcgtggac
tatgtggccagccagggttacaaccgccaagaagctgcccgggtgggtgttgtgttcgtggacgaggtgcctaaagga
ctgaccggcaagttggacgcccgaagatccgcgagattctcattaaggccaagaagggcggaagatcgccgtg

```

9.4 Generierte Proteinsequenzen und deren Parameter

Alle Proteinsequenzen wurden mittels frei verfügbarer Internetsoftware *Translate tool* aus den klonierten DNA-Sequenzen ermittelt. Die Proteinparameter der resultierenden Proteinsequenzen wurden mit der frei verfügbaren Internetsoftware *ProtParam tool* bestimmt.^[334] Das *N*-terminal resultierende His₆-Tag inklusive Linkersequenz (in **K1**) bzw. durch Proteasen in **K2** verbliebene Rudimente sind grau, relevante Aminosäuren (Cys und Ala) rot und die für **A** kodierenden Sequenzen orange markiert. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten beruht auf der Annahme, dass alle eventuell vorhandenen Cysteinreste reduziert vorliegen. Die jeweiligen Konstrukt-zugehörigen Vektorkarten sind in Kapitel 9.5 dargestellt.

Aus Konstrukt K1 generiertes Proteintemplat T**Proteinsequenz**

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLQVAIFPTPDPAAALKDRRME
NLVAYAKKVEGDMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR

Anzahl der Aminosäuren: 120, Molekulargewicht (MW): 13762,5 Da, isoelektrischer Punkt (pI): 9,60,
Summenformel: C₅₉₅H₉₄₁N₁₉₁O₁₇₅S₆, Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser: 12950 M⁻¹·cm⁻¹

Aus Konstrukt K2 generiertes Proteintemplat T**Proteinsequenz**

GAMGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLQVAIFPTPDPAAALKDRRMENLVAYAKKVEGDMYESANSRDEYYHLLAEKI
YKIQKELEEKRRSR

Anzahl der Aminosäuren: 89, Molekulargewicht (MW): 10477,9 Da, isoelektrischer Punkt (pI): 9,22,
Summenformel: C₄₆₃H₇₃₈N₁₃₈O₁₃₄S₃, Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser: 12950 M⁻¹·cm⁻¹

Aus Konstrukt K3 generiertes cA-HSP**Proteinsequenz**

MCDDGNILPSDIMDFVLKNTPSWENLYFQGAMAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAF
TDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDKRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPVQVINDGDKPKVQVSYKGDTKAFYPEEI
SSMVLTKMKEIAEAYLGYPVNTAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDRTGKGERN
VLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHVFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACER
AKRTLSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIP
KVQKLLQDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLTAGGVMTALIKRNST
IPTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVTATDKS
TGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDEVQRERVSAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGGKISEADKKK
VLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIISGLYQGAGGPGGGFGAQQGPKGGSGSGPTIEEVDLEV
LFQGPLEHHHHHHH

Anzahl der Aminosäuren: 687, Molekulargewicht (MW): 75504,3 Da, isoelektrischer Punkt (pI): 5,42,
Summenformel: C₃₃₃₀H₅₃₀₅N₉₂₃O₁₀₄₃S₁₇, Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser: 40340 M⁻¹·cm⁻¹

Aus Konstrukt K4 generiertes aA-HSP**Proteinsequenz**

MADDGNILPSDIMDFVLKNTPSWENLYFQGAMAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAF
TDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDKRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPVQVINDGDKPKVQVSYKGDTKAFYPEEI
SSMVLTKMKEIAEAYLGYPVNTAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDRTGKGERN
VLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHVFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACER
AKRTLSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIP
KVQKLLQDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLTAGGVMTALIKRNST
IPTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGRFELSGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVTATDKS
TGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDEVQRERVSAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGGKISEADKKK
VLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIISGLYQGAGGPGGGFGAQQGPKGGSGSGPTIEEVDLEV
LFQGPLEHHHHHHH

Anzahl der Aminosäuren: 687, Molekulargewicht (MW): 75472,2 Da, isoelektrischer Punkt (pI): 5,42,
Summenformel: C₃₃₃₀H₅₃₀₅N₉₂₃O₁₀₄₃S₁₆, Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser: 40340 M⁻¹·cm⁻¹

Aus Konstrukt K5 generiertes HSP-cA**Proteinsequenz**

MAKAAAIGIDLGTTSYCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDARLIG
 RKFGDPVVQSDMKHWPFFQVINDGDKPKVQVSYKGDTKAFYP EEISSMVLTKMKEIAEAYLGYPVNTAVITVPAYF
 NDSQRQATKDAGVIAGLNLVLRINEPTAAAIAAYGLDRTGKGERNVLI FDLGGGTFDVSILTI DDGIFEVKATAGD
 THLGGEDFDNRLVNHVFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRLRTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRA
 RFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAV
 QAAILMGDKSENVQDLLLLLDVAPLSLGLTAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGGERAMT
 KDNLLGRFELS GIPAPRGVPIEVTFDIDANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAEKY
 KADEVQRERVS AKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGI SEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEF EHKRKELE
 QVCNPIISGLYQAGGPGPGGFGAQQGPKGGSGSPTIEEV DLEVLV FQGPLEPAFDGQNPDEGNAENLYFQGM **CDD**
GNILPSDIMDFVLKNTPSWLEVLV FQGPLEHHHHHH

Anzahl der Aminosäuren: 709, Molekulargewicht (MW): 77872,8 Da, isoelektrischer Punkt (pI): 5,22,
 Summenformel: $C_{3436}H_{5459}N_{949}O_{1079}S_{17}$, Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser: $40340 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Aus Konstrukt K6 generiertes HSP-A A**Proteinsequenz**

MAKAAAIGIDLGTTSYCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDARLIG
 RKFGDPVVQSDMKHWPFFQVINDGDKPKVQVSYKGDTKAFYP EEISSMVLTKMKEIAEAYLGYPVNTAVITVPAYF
 NDSQRQATKDAGVIAGLNLVLRINEPTAAAIAAYGLDRTGKGERNVLI FDLGGGTFDVSILTI DDGIFEVKATAGD
 THLGGEDFDNRLVNHVFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRLRTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRA
 RFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAV
 QAAILMGDKSENVQDLLLLLDVAPLSLGLTAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGGERAMT
 KDNLLGRFELS GIPAPRGVPIEVTFDIDANGILNVTATDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAEKY
 KADEVQRERVS AKNALESYAFNMKSAVEDEGLKGI SEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEF EHKRKELE
 QVCNPIISGLYQAGGPGPGGFGAQQGPKGGSGSPTIEEV DLEVLV FQGPLEPAFDGQNPDEGNAENLYFQGM **ADD**
GNILPSDIMDFVLKNTPSWLEVLV FQGPLEHHHHHH

Anzahl der Aminosäuren: 709, Molekulargewicht (MW): 77840,8 Da, isoelektrischer Punkt (pI): 5,22,
 Summenformel: $C_{3436}H_{5459}N_{949}O_{1079}S_{16}$, Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser: $40340 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Aus Konstrukt K7 generierte cA-Luc**Proteinsequenz**

CGNILPSDIMDFVLKNTLEVLV FQGPHEMADAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEV
 DITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLNSMGISQPT
 VV FVSKKGLQKILNVQKKLP I IQK I IIMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSS
 GSTGLPKGVALPHRTACVRF SHARDPIFGNQIIPDTAILSVVPPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVMYRFEEELFL
 RSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSI
 LITPEGDDKPGAVGKVVVFFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIA
 YWDEDEHFFIVDRLKSLIKYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIV
 DYVASQVTTAKKLRGGVVVDEVPKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKIAV

Anzahl der Aminosäuren: 576, Molekulargewicht (MW): 63527,4 Da, isoelektrischer Punkt (pI): 6,05,
 Summenformel: $C_{2886}H_{4534}N_{744}O_{827}S_{20}$, Extinktionskoeffizient bei 280 nm in Wasser: $39310 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

9.5 Vektorkarten

Vektorkarten der verwendeten Ausgangskonstrukte

Aufgeführt sind die Vektorkarten der vier in dieser Arbeit für Klonierungsarbeiten verwendeten Ausgangskonstrukte, mit *hsp70*- bzw. *luc2*-Sequenz in orange, Affinitätstags (*gst* bzw. *His₆*) in blau, THB-CS (Thrombinerkennungssequenz) in hellorange, Antibiotikumresistenz-verleihende Sequenzen (AmpR für Ampizilinresistenz, KanR für Kanamycinresistenz) in hellgelb und diverse Erkennungs-, Promotor- und Terminatorsequenzen in hellgrau. Der jeweilige Polylinker (MSC, *multiple cloning site*) ist rot markiert.

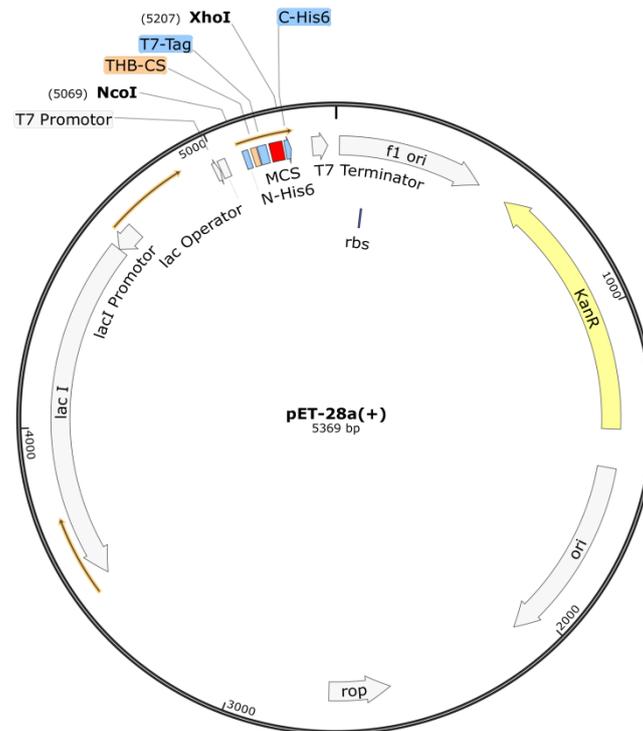


Abbildung 68: Vektorkarte von pET-28a(+) der Firma Novagen.

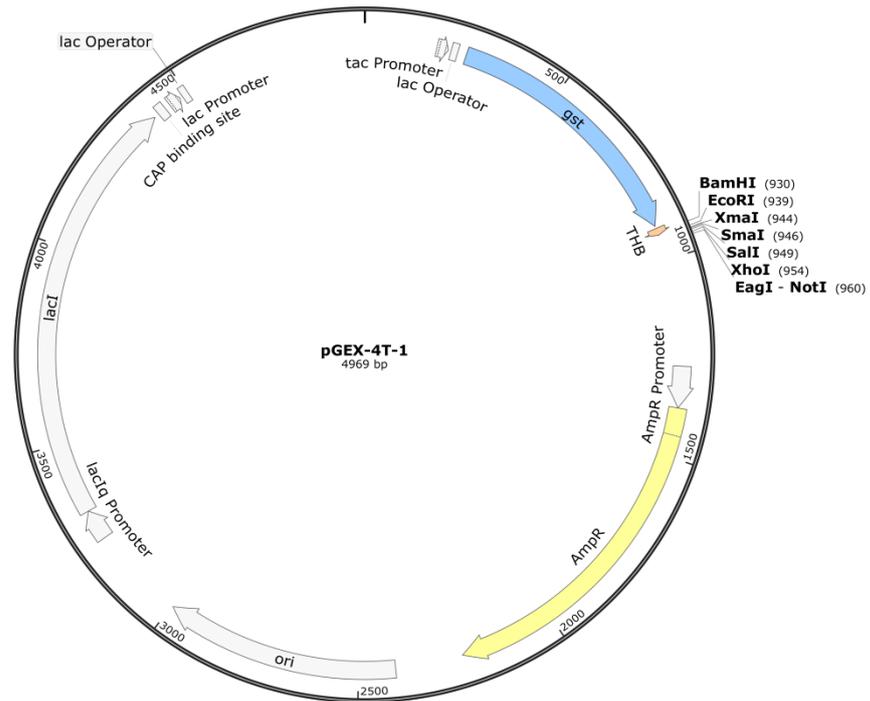


Abbildung 69: Vektorkarte von pGEX-4T-1 der Firma GE Healthcare.

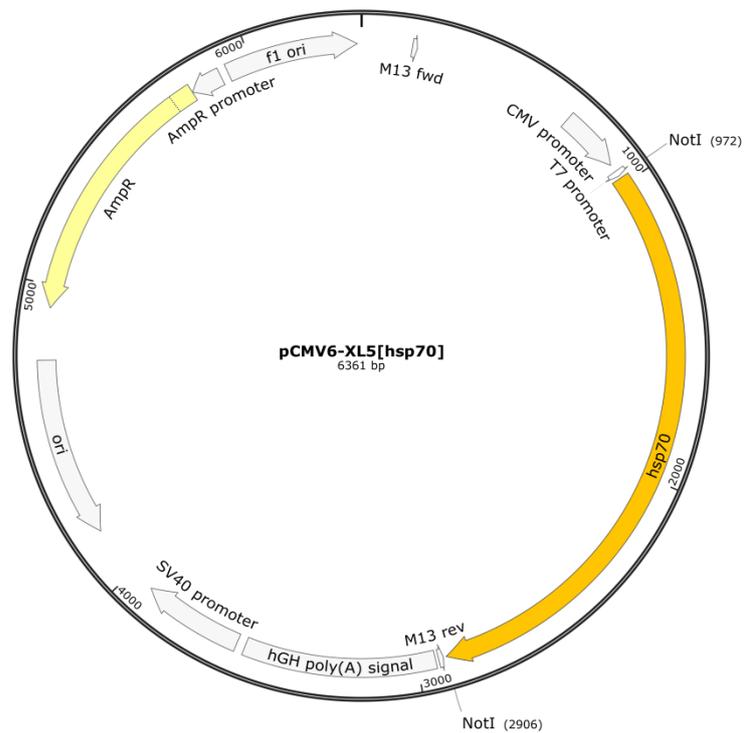


Abbildung 70: Vektorkarte von pCMV6-XL5[hsp70] der Firma OriGene. Dieser Vektor enthielt die Ausgangssequenz für das Zielprotein HSP (HSP70).

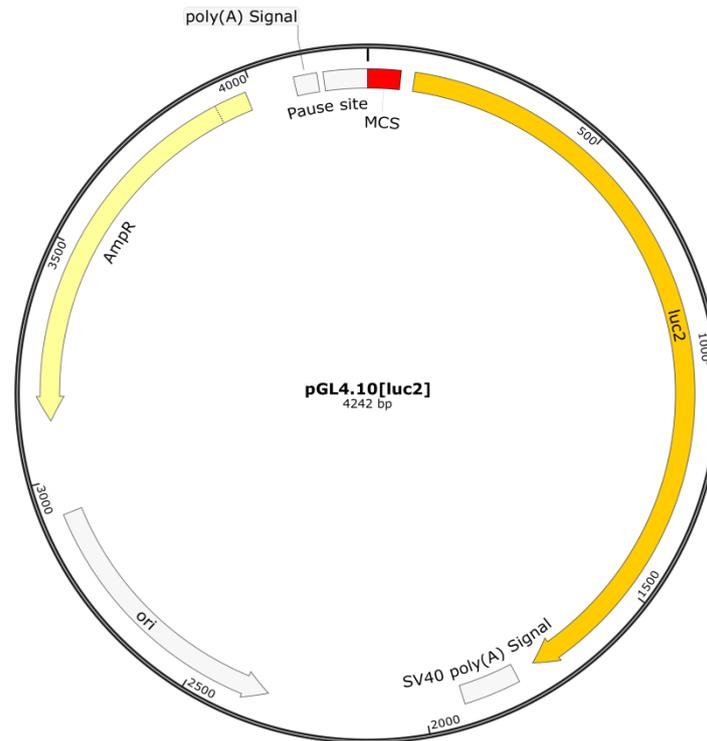


Abbildung 71: Vektorkarte von pGL.10[luc2] der Firma Promega. Dieser Vektor enthielt die Ausgangssequenz für das Zielprotein **Luc** (Luc2).

Vektorkarten der erstellten Vektorkonstrukte

Aufgeführt sind die Vektorkarten aller sieben in dieser Arbeit erstellten Vektorkonstrukte **K1 – K7**, die für die in Kapitel 9.4 angegebenen Proteinsequenzen kodieren, mit *kix*-Sequenz (kodiert für das Proteintemplat **T**, dunkelgrau), *tad*-Sequenz (**a** kodiert für das Peptid **A**, dunkelorange), *hsp70*- bzw. *luc2*-Sequenz orange, Sequenzen von Affinitätstags (*gst* bzw. His₆, blau), für Cys oder Ala kodierende Sequenzen (rot), TEV-CS (Erkennungssequenz der TEV-Protease, grün), THB-CS (Thrombinerkennungssequenz, hellorange), PRE-CS (Precisionerkennungssequenz, violett), Antibiotikumresistenz-verleihende Sequenzen (AmpR für Ampizilinresistenz, KanR für Kanamycinresistenz, hellgelb) sowie diverse Erkennungs-, Promotor- und Linkersequenzen (hellgrau). Der jeweilige offene Leserahmen (*open reading frame*, orf) ist mit einem orangefarben umrahmten Pfeil angedeutet.

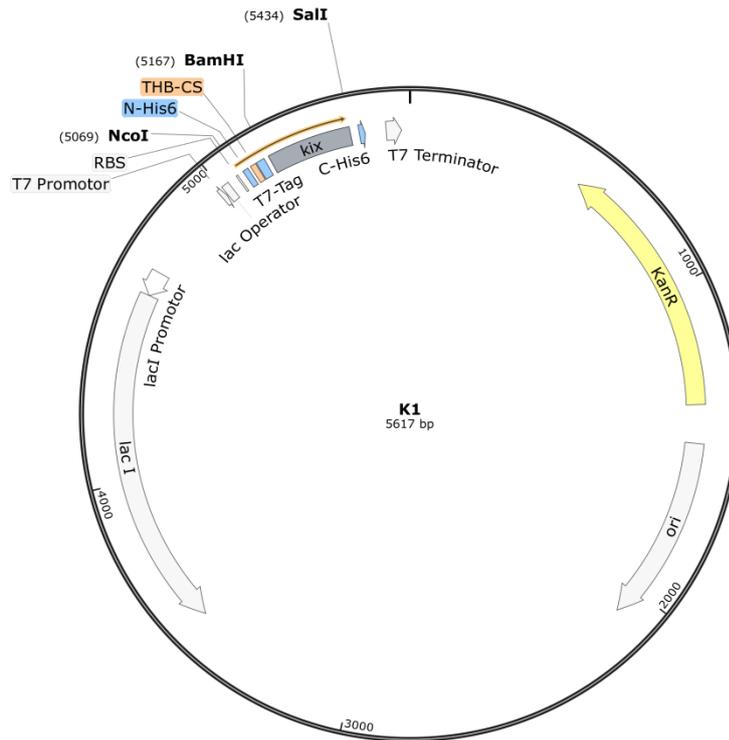


Abbildung 72: Vektorkarte des Konstrukts **K1**, welches für His₆-KIX kodiert. Dabei ist KIX das Proteintemplat **T**.

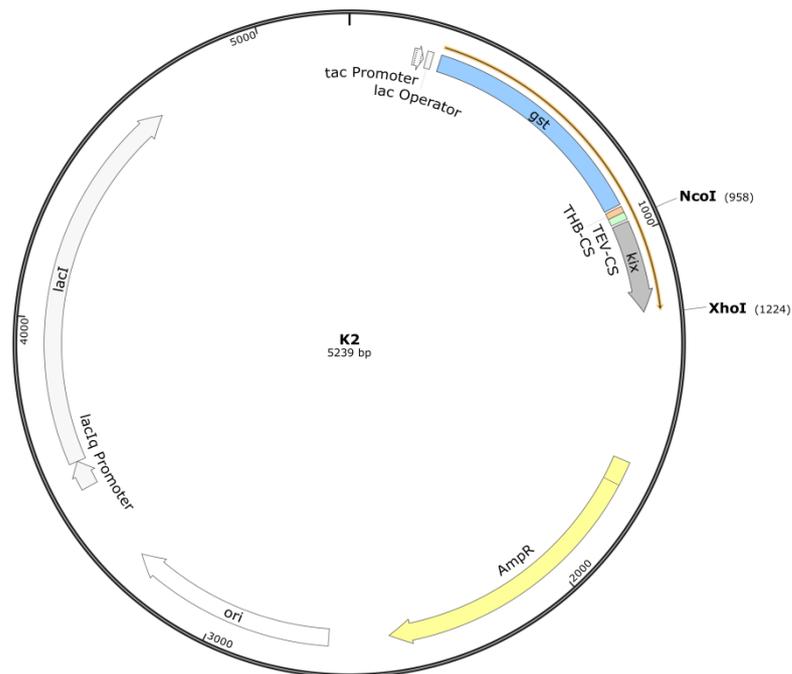


Abbildung 73: Vektorkarte des Konstrukts **K2**, welches für GST-KIX kodiert. Dabei ist KIX das Proteintemplat **T**.

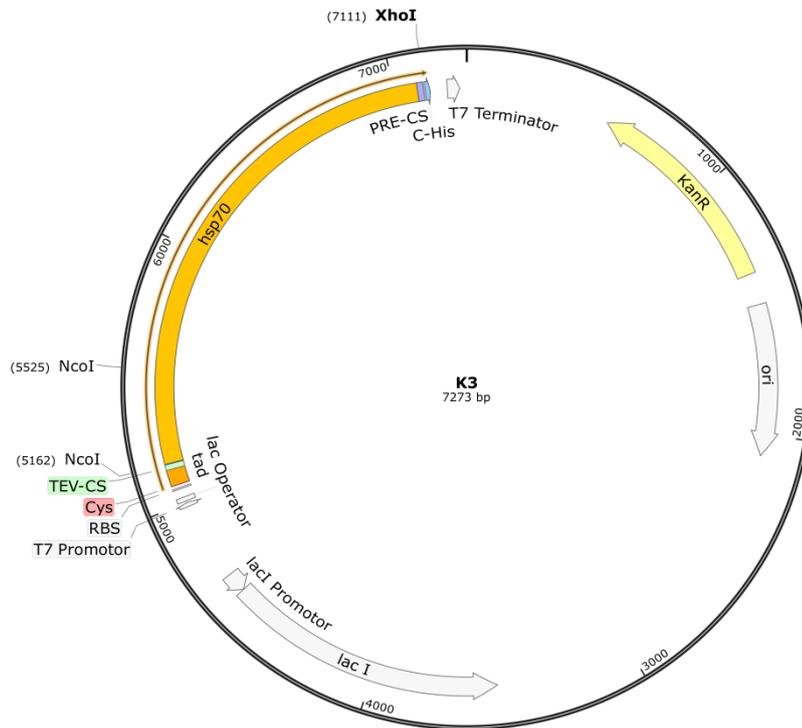


Abbildung 74: Vektorkarte des Konstrukts **K3**, welches für α A-HSP kodiert, mit *tad* (α) als für **A** kodierende Sequenz und *hsp70* als für **HSP** kodierende Sequenz.

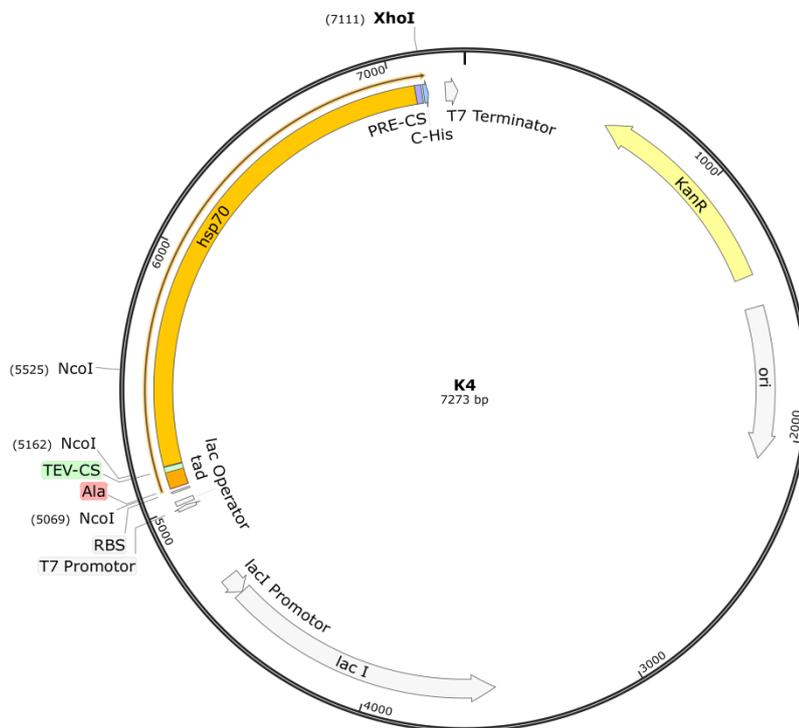


Abbildung 75: Vektorkarte des Konstrukts **K4**, welches für α A-HSP kodiert, mit *tad* (α) als für **A** kodierende Sequenz und *hsp70* als für **HSP** kodierende Sequenz.

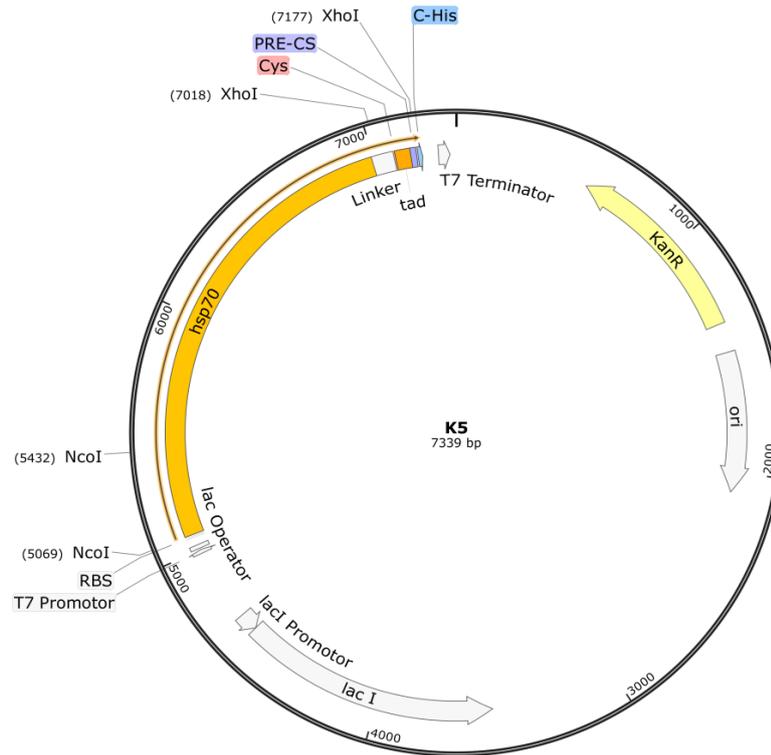


Abbildung 76: Vektorkarte des Konstrukts **K5**, welches für **HSP- α** kodiert mit, *tad* (α) als für **A** kodierende Sequenz und *hsp70* als für **HSP** kodierende Sequenz.

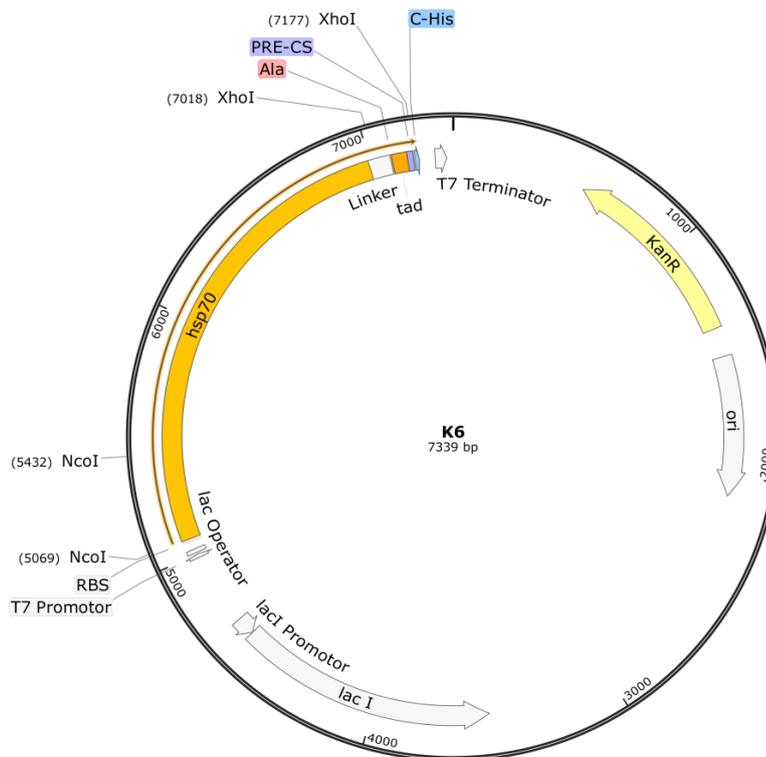


Abbildung 77: Vektorkarte des Konstrukts **K6**, welches für **HSP- β** kodiert mit, *tad* (α) als für **A** kodierende Sequenz und *hsp70* als für **HSP** kodierende Sequenz.

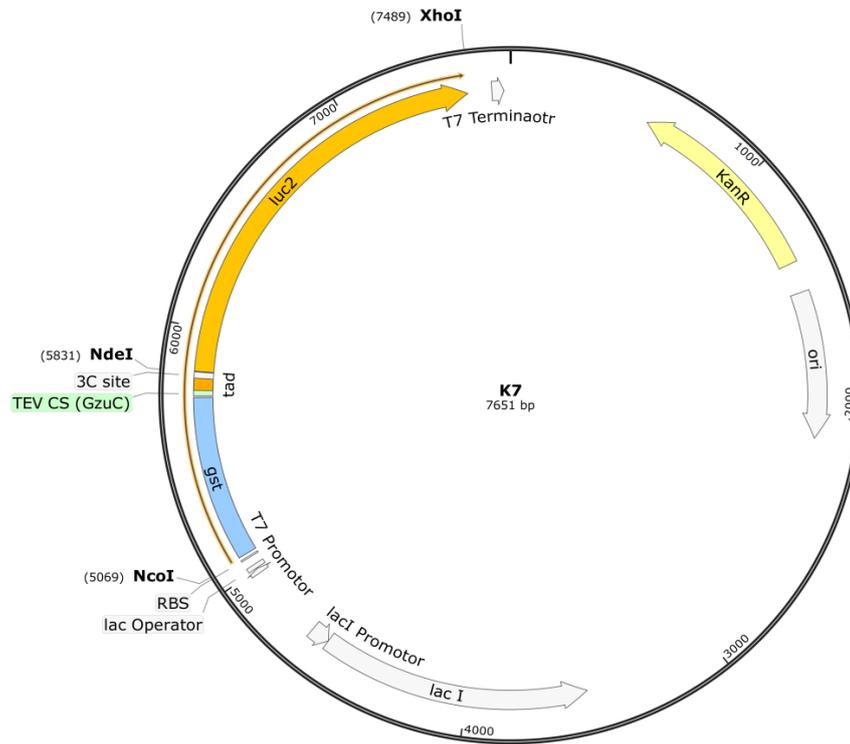


Abbildung 78: Vektorkarte des Konstrukts **K7**, welches für **GST-TEV-cA-Luc** bzw. nach TEV-Verdau **cA-Luc** kodiert, mit *tad* (**a**) als für **A** kodierende Sequenz und *luc2* als für **Luc** kodierende Sequenz.

9.6 Sequenzierungsergebnisse

Die oberste Sequenz ist stets die des Zielkonstrukts (**K1 – K7**) im Zielvektor. Die mittlere Sequenz beinhaltet ausschließlich das jeweilige Zielgen aus **K1 – K7**. Die Untere Sequenz entspricht dem Sequenzierungsergebnis durch den jeweils angegebenen Primer (P01 – P19). Die Start- und Stop-Sequenzen (atg bzw. taa und tga) des Zielkonstrukts sind grau, relevante Basentriplets (tgc für Cys oder gcc bzw. gcg für Ala und Punktmutationen (g zu c in **K1**) sind rot markiert.

Konstrukt K1 (kodiert für T)

Anfang

```

K1  gtggacagcaaatgggtcgcggatccggtgtaaggaaaggctggcacgaacatgtcact...
Zielgen -----ggtgtaaggaaaggctggcacgaacatgtcact...
P01  gtggacagcaaatgggtcgcggatccggtgtaaggaaaggctggcacgaacatgtcact...

```

Ende

```

K1  ...ctacaagatacaaaaagaactagaagaaaaacggaggtcgcggttaa|ctcgacaagcttg
Zielgen ...ctacaagatacaaaaagaactagaagaaaaacggaggtcgcggttaa-----
P01  ...ctacaagatacaaaaagaactagaagaaaaacggaggtcgcggttaa|ctcgacaagcttg

```

Konstrukt K2 (kodiert für T)

Anfang

```

K2  ctgaaaacctttattttcagggcgccatgggtgtaaggaaaggctggcacgaacatgtc...
Zielgen -----atgggtgtaaggaaaggctggcacgaacatgtc...
P05  ctgaaaacctttattttcagggcgccatgggtgtaaggaaaggctggcacgaacatgtc...

```

Ende

```

K2  ...ctacaagatacaaaaagaactagaagaaaaacggaggtcgcggtgactcgagcggccgc
Zielgen ...ctacaagatacaaaaagaactagaagaaaaacggaggtcgcggtgactcgagcggccgc
P05  ...ctacaagatacaaaaagaactagaagaaaaacggaggtcgcggtgactcgagcggccgc

```

Konstrukt K3 (kodiert für α -HSP)

Anfang

```

K3  ctttaagaaggagatataccatgtgcgatgacggcaacattctgccgtccgatattatg...
Zielgen -----atgtgcgatgacggcaacattctgccgtccgatattatg...
P01  ctttaagaaggagatataccatgtgcgatgacggcaacattctgccgtccgatattatg...

```

Ende

K3 ...aggtagatctggaagtgctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccactga
 Zielgen ...aggtagatctggaagtgctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccactga
 P02 ...aggtagatctggaagtgctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga

Konstrukt K4 (kodiert für α A-HSP)

Anfang

K4 ctttaagaaggagatataaccatggccgatgacggcaacattctgccgtccgatattatg...
 Zielgen -----atggccgatgacggcaacattctgccgtccgatattatg...
 P01 ctttaagaaggagatataaccatggccgatgacggcaacattctgccgtccgatattatg...

Ende

K4 ...aggtagatctggaagtgctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga
 Zielgen ...aggtagatctggaagtgctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga
 P02 ...aggtagatctggaagtgctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga

Konstrukt K5 (kodiert für HSP- α A)

Anfang

K5 agaaggagatataaccatggccaaagccgcggcgatcggcatcgacctgggcaccaccta...
 Zielgen -----atggccaaagccgcggcgatcggcatcgacctgggcaccaccta...
 P01 agaaggagatataaccatggccaaagccgcggcgatcggcatcgacctgggcaccaccta...

Ende

K5 ...ggcatgtgggatgacg...ctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga
 Zielgen ...ggcatgtgggatgacg...ctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga
 P02 ...ggcatgtgggatgacg...ctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga

Konstrukt K6 (kodiert für HSP- α A)

Anfang

K6 agaaggagatataaccatggccaaagccgcggcgatcggcatcgacctgggcaccaccta...
 Zielgen -----atggccaaagccgcggcgatcggcatcgacctgggcaccaccta...
 P01 agaaggagatataaccatggccaaagccgcggcgatcggcatcgacctgggcaccaccta...

Ende

K6 ...ggcatggcggatgacg...ctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga
 Zielgen ...ggcatggcggatgacg...ctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga
 P02 ...ggcatggcggatgacg...ctggtttcagggcccgcctcgagcaccaccaccaccaccactga

Konstrukt K7 (kodiert für cA-Luc)**Anfang**

K7 agaaggagatataccatgggcatgtcccctatactagggtattggaaaattaagggcct...
 Zielgen -----atgggcatgtcccctatactagggtattggaaaattaagggcct...
 P18 agaaggagatataccatgggcatgtcccctatactagggtattggaaaattaagggcct...

Für Cys kondierende TEV-Erkennungssequenz

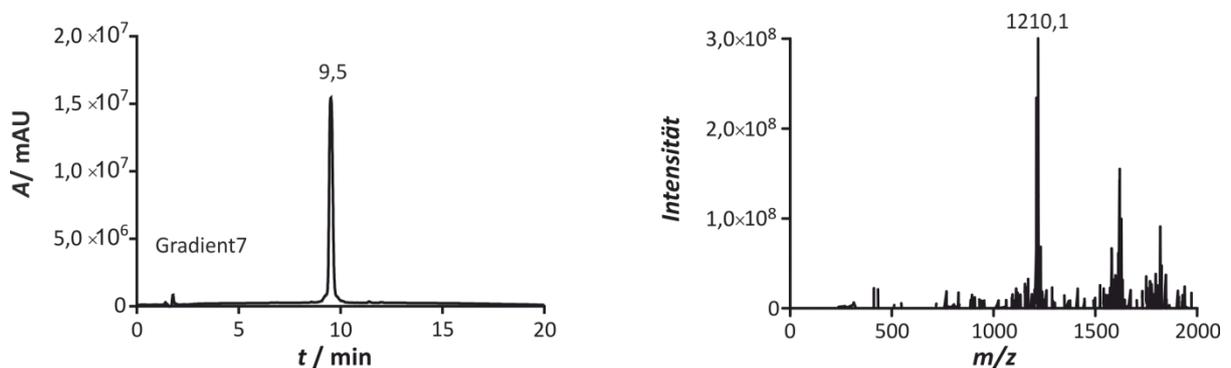
K7 ...accatcctccaaaatcggatgaaaacctgtattttcagTgcggcaacattctgccgtc...
 TEV-Sequenz -----gaaaacctgtattttcagTgc-----
 P01 ...accatcctccaaaatcggatgaaaacctgtattttcagTgcggcaacattctgccgtc...

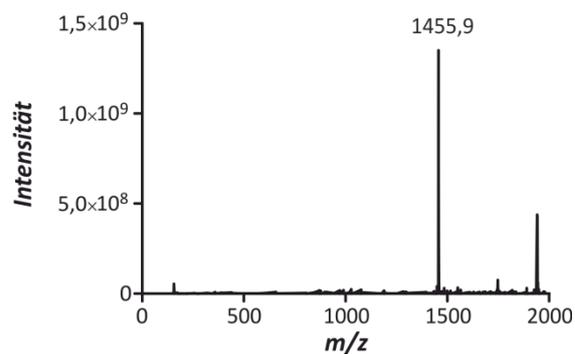
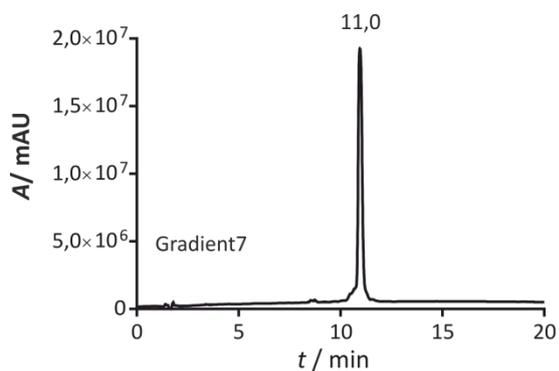
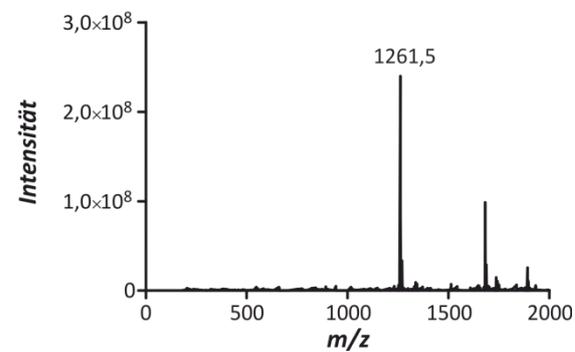
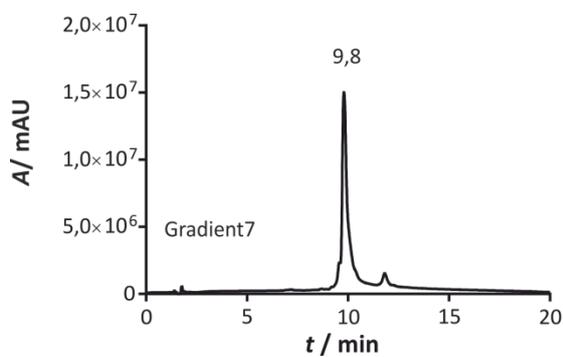
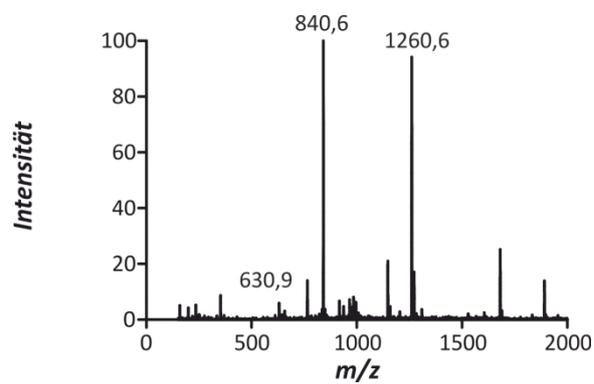
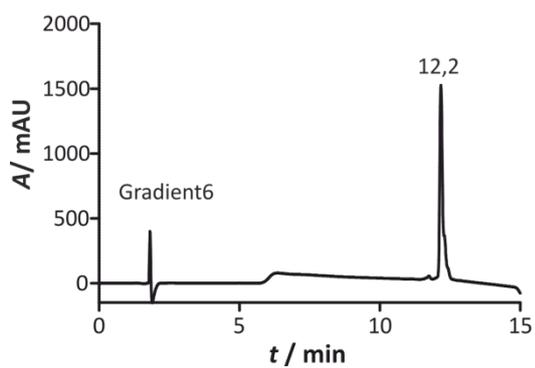
Ende

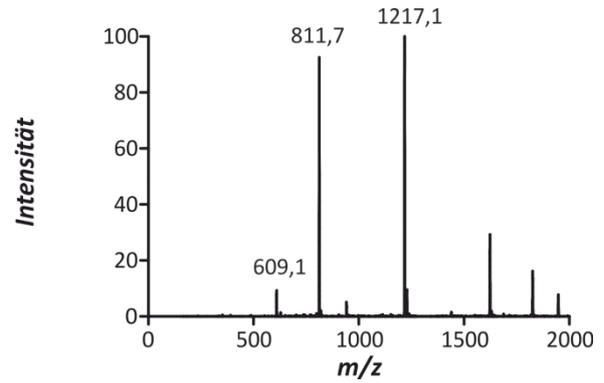
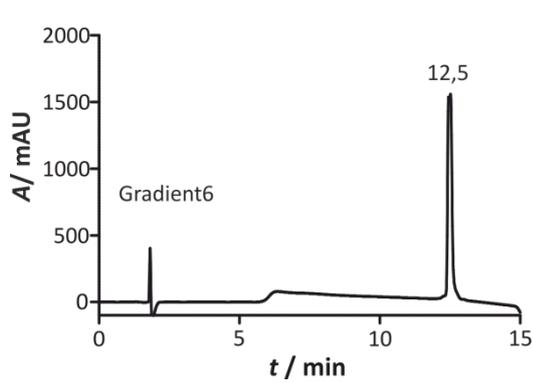
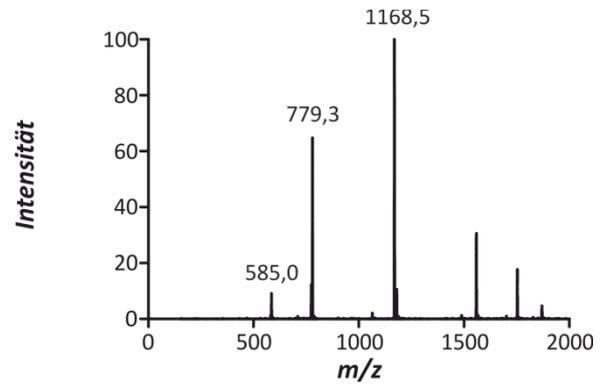
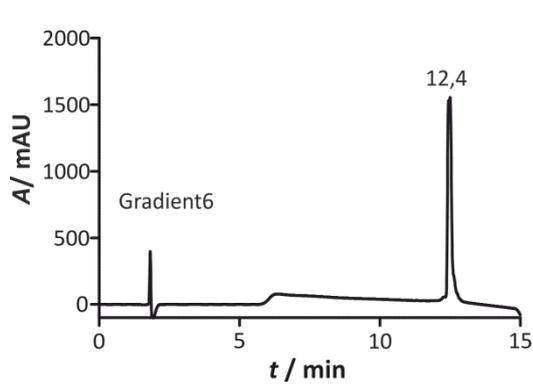
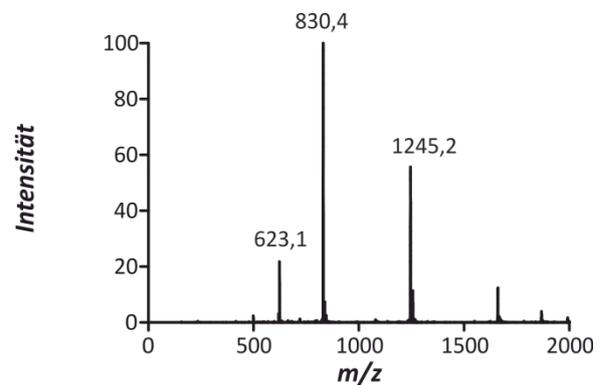
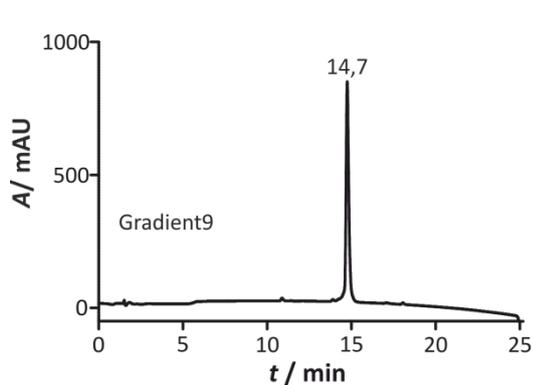
K7 ...gagattctcattaaggccaagaagggcggaagatcgccgtgtaatgactcgagcacca
 Zielgen ...gagattctcattaaggccaagaagggcggaagatcgccgtgtaa-----
 P19 ...gagattctcattaaggccaagaagggcggaagatcgccgtgtaatgactcgagcacca

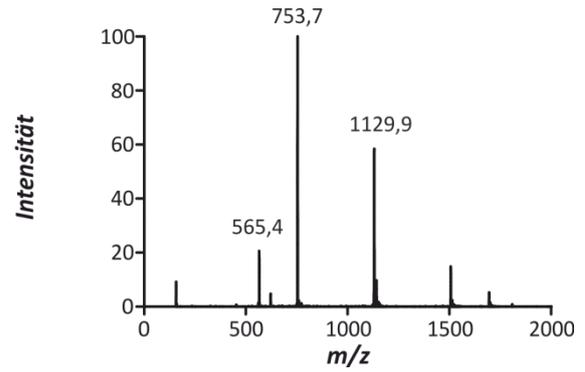
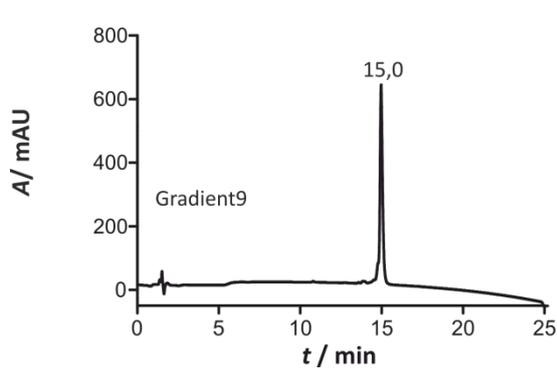
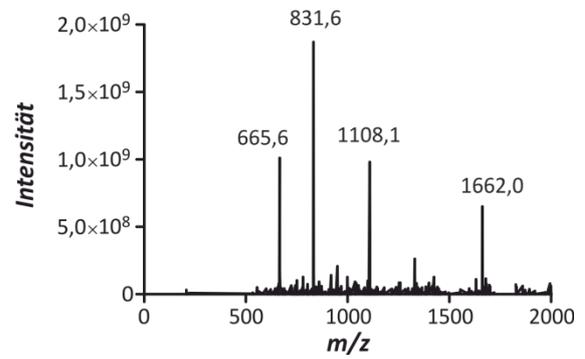
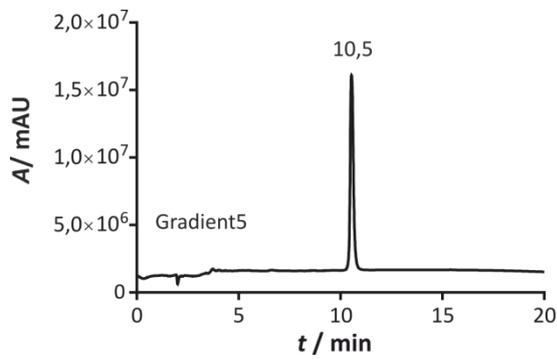
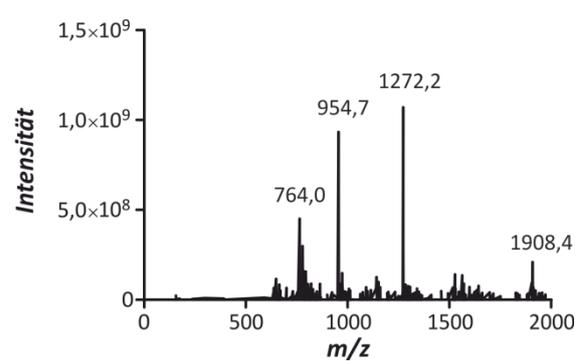
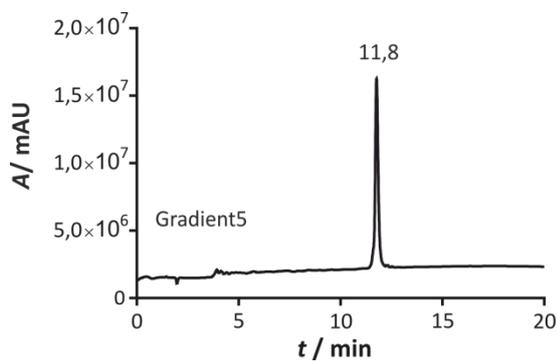
9.7 HPLC-MS-Analytik der erstellten Peptidvarianten

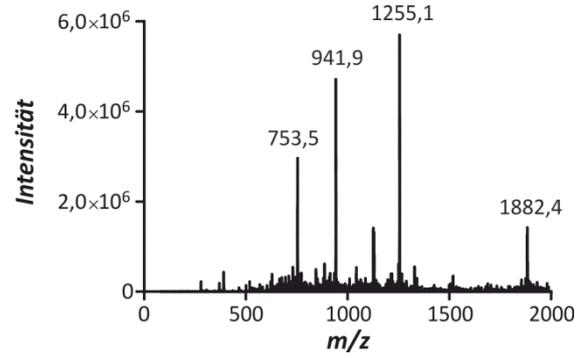
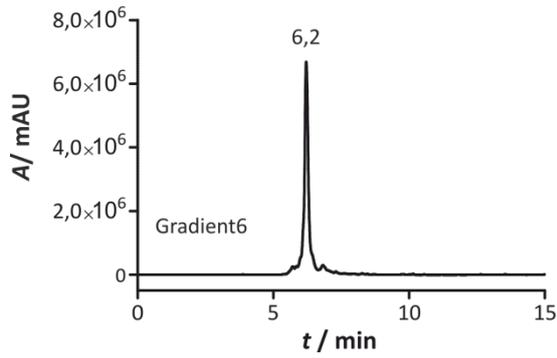
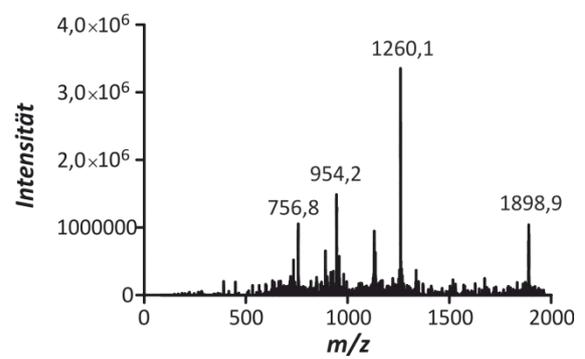
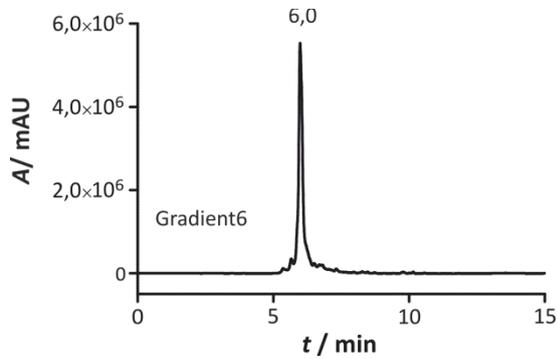
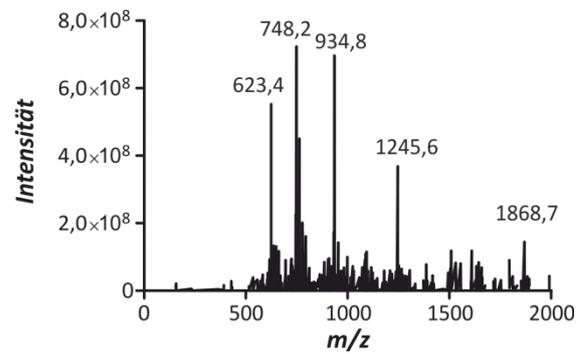
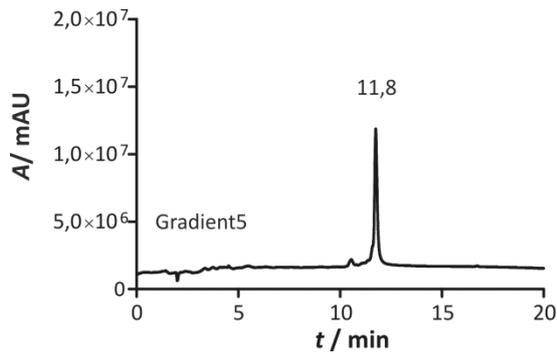
Sämtliche HPLC-Chromatogramme (links) wurden bei 210 nm aufgenommen. Die verwendeten Gradienten sowie die resultierenden Retentionszeiten und m/z-Verhältnisse innerhalb der Massenspektren (rechts) sind angegeben.

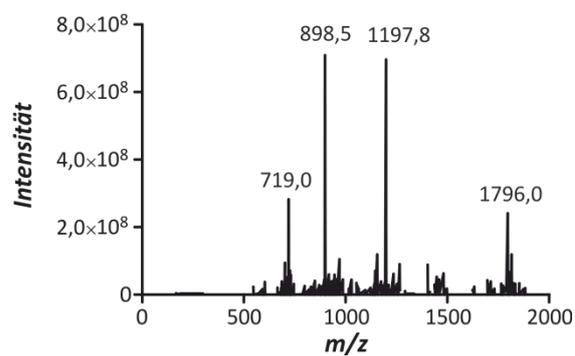
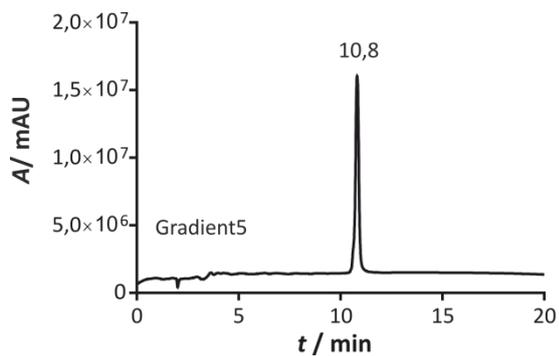
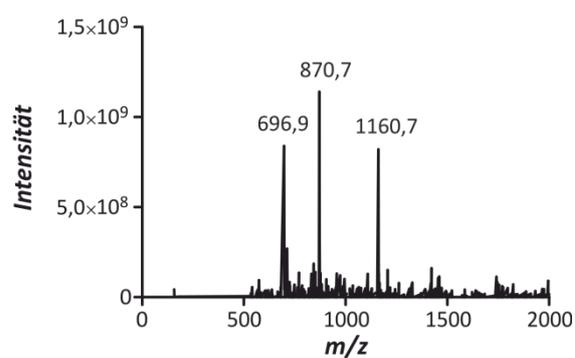
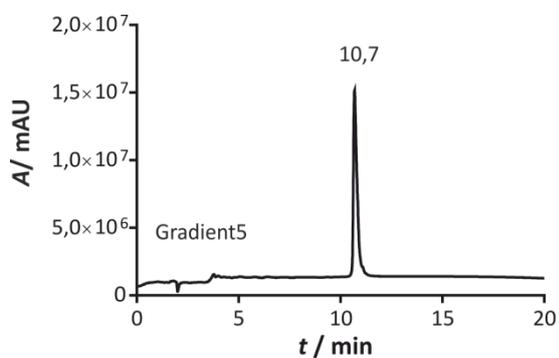
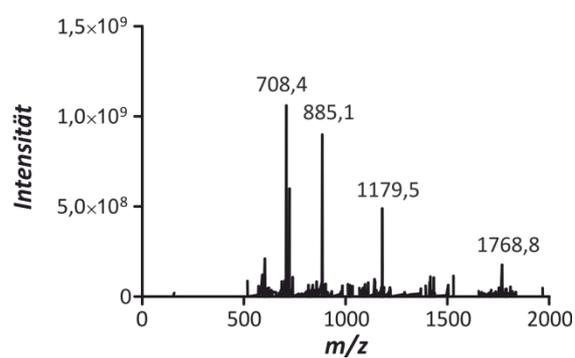
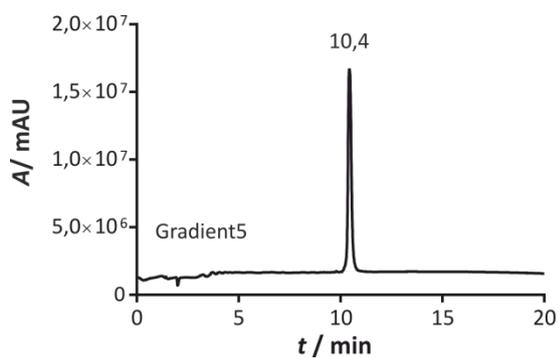
A0 Ac-DDGNILPSDIMDFVLKNTPSW-NH₂ (M: 2418,68 g·mol⁻¹)

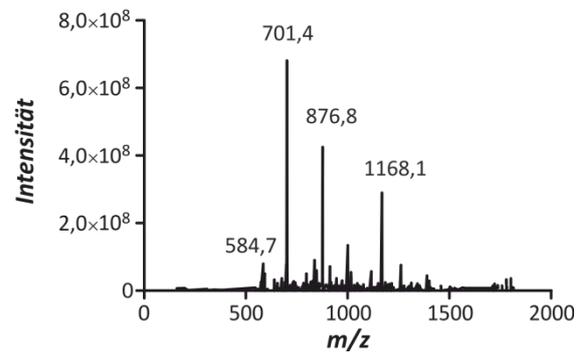
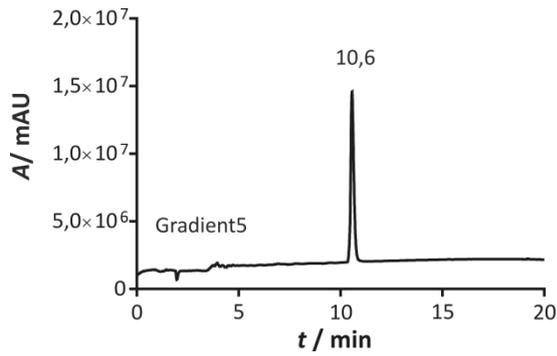
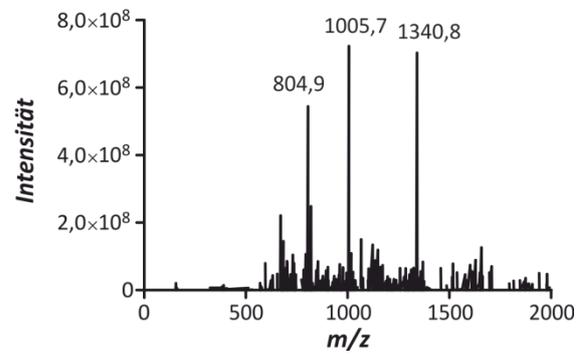
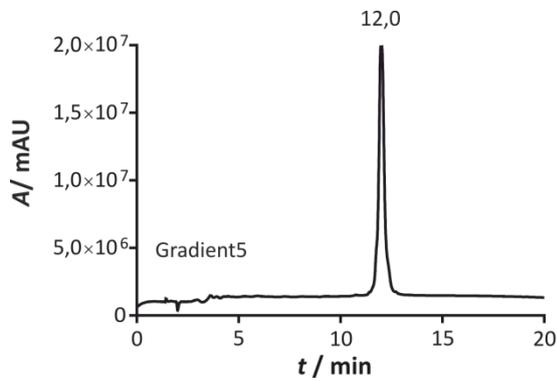
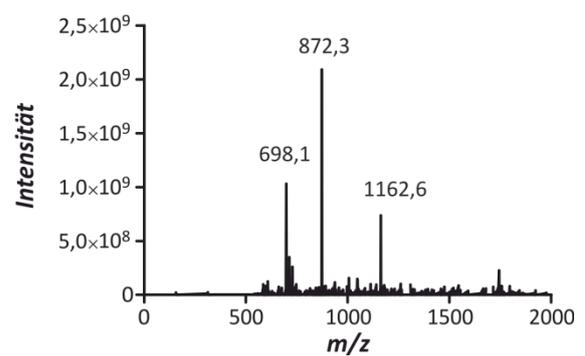
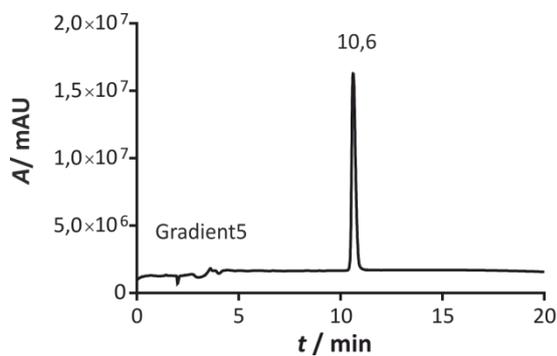
A0* FITC-PEG1-DDGNILPSDIMDFVLKNTPSW-NH₂ (M: 2911,18 g·mol⁻¹)**A1** Ac-CDDGNILPSDIMDFVLKNTPSW-NH₂ (M: 2521,82 g·mol⁻¹)**A2*** Ac-GNILPSDIMDFVLKNTPSK(FITC)-NH₂ (M: 2519,84 g·mol⁻¹)

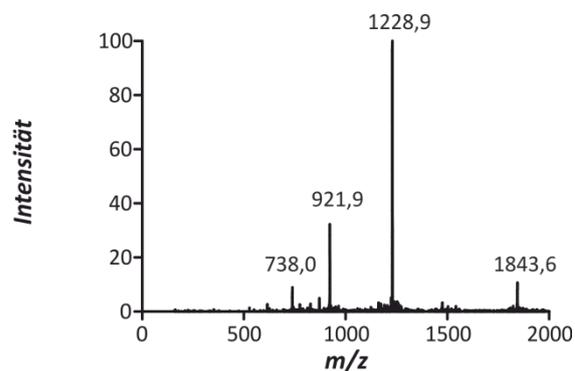
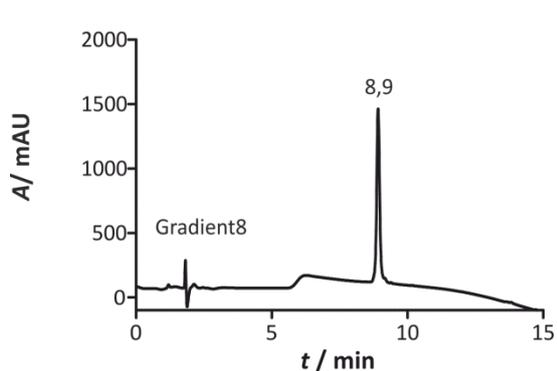
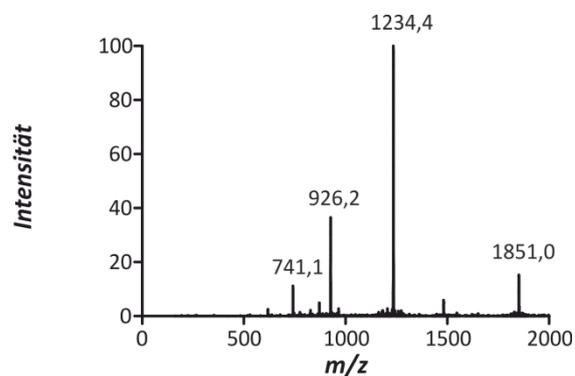
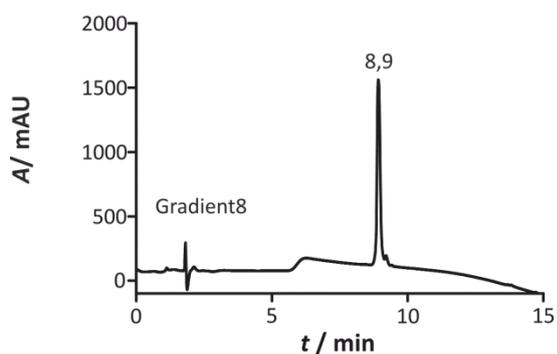
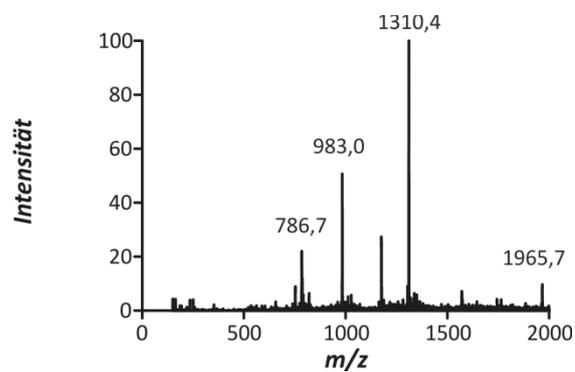
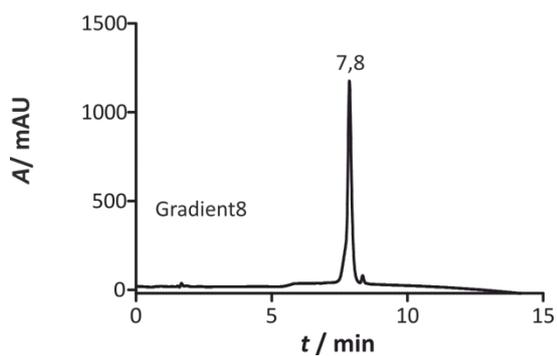
A3* Ac-GNILPSDIMDFVLKNTPK(FITC)-NH₂ (M: 2432,77 g·mol⁻¹)**A4*** Ac-GNILPSDIMDFVLKNTK(FITC)-NH₂ (M: 2335,65 g·mol⁻¹)**A5** H₂N-CDDGNILPSDIMDFVLKNTK(DABCYL)-NH₂ (M: 2486,63 g·mol⁻¹)

A6 H₂N-CGNILPSDIMDFVLKNTK(DABCYL)-NH₂ (M: 2256,45 g·mol⁻¹)**B0** Ac-DSQKRREILSRPpSYRKILNDLSSDAP-NH₂ (M: 3322,58 g·mol⁻¹)**B0*** FITC-PEG1-DSQKRREILSRPpSYRKILNDLSSDAP-NH₂ (M: 3815,08 g·mol⁻¹)

B0*(pS133D) FITC-PEG1-DSQKRREILSRRPDYRKILNDLSSDAP-NH₂ (M: 3763,12 g·mol⁻¹)**B0*(pS133E) FITC-PEG1-DSQKRREILSRPEYRKILNDLSSDAP-NH₂** (M: 3777,14 g·mol⁻¹)**B0*(pS133S) FITC-PEG1-DSQKRREILSRPSYRKILNDLSSDAP-NH₂** (M: 3735,16 g·mol⁻¹)

B1 CHCH[C(O)]₂N-(CH₂)₃CO-PEG1-**DSQKRREILSRPpSYRKILNDLSSDAP**-NH₂ (M: 3590,85 g·mol⁻¹)

B2 CH₂CHCO-PEG1-**DSQKRREILSRPpSYRKILNDLSSDAP**-NH₂ (M: 3479,75 g·mol⁻¹)

B3 (CH₃)₂NCH₂CHCHCO-PEG1-**DSQKRREILSRPpSYRKILNDLSSDAP**-NH₂ (M: 3536,85 g·mol⁻¹)


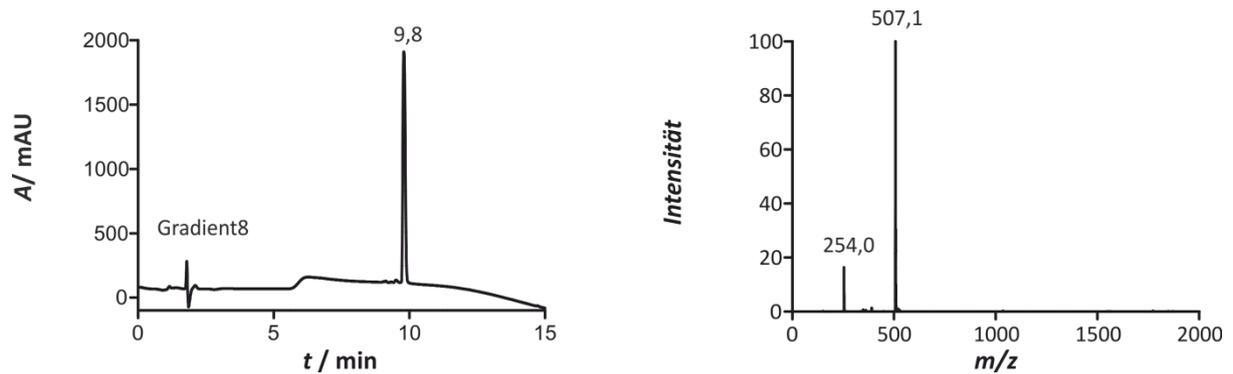
B4 ClCH₂CO-PEG1-DSQKRREILSRRPpSYRKILNDLSSDAP-NH₂ (M: 3502,19 g·mol⁻¹)**B4*** ClCH₂CO-PEG1-DSQKRREILSRRPpSYRKILNDLSSDAPK(FITC)-NH₂ (M: 4019,74 g·mol⁻¹)**B5** FCH₂CO-PEG1-DSQKRREILSRRPpSYRKILNDLSSDAP-NH₂ (M: 3485,73 g·mol⁻¹)

B6* FITC-PEG1-**DAQARREILSRRPpSYRAILNDLSSDAP**-NH₂ (M: 3684,90 g·mol⁻¹)**B7*** FITC-PEG1-**DSQARREILSRRPpSYRAILNDLSSDAP**-NH₂ (M: 3700,90 g·mol⁻¹)**D*** Ac-C[FITC-NH(CH₂)₄CO]**DAQARREILSRRPpSYRAILNDLSSDAP**-NH₂ (M: 3929,21 g·mol⁻¹)

9.8 HPLC-MS-Analytik der Reportergruppe F

Das HPLC-Chromatogramm (links) wurde bei 210 nm aufgenommen. Der verwendete Gradient sowie die resultierende Retentionszeit und m/z -Verhältnisse innerhalb des Massenspektrums (rechts) sind angegeben.

F FITC-5-Aminovaleriansäure (M: $506,53 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



9.9 Rohdaten zu den Verknüpfungs- und Transferversuchen

Rohdaten zu den initialen Testreaktionen mit Glutathion

Tabelle 35: Produktkonzentrationen in M und Ausbeuten η in % der initialen Testreaktionen von **B1 – B5** in Gegenwart von **GSH**, die aus der Integration der HPLC-Signale resultieren. Die schwarzen Werte wurden zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeiten verwendet. qu. = quantitativer Umsatz, d. h. Peptid **B1** war zum jeweiligen Messzeitpunkt nicht mehr nachweisbar. # = Dieser Wert wurde als untere Grenze zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit verwendet. * = Basierend auf der Nachweisgrenze der HPLC wurde dieser Wert als obere Grenze zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit verwendet. Für Details siehe Kapitel 5.10.1 , Prozessierung der kinetischen Daten‘.

t / s	B1	B2	B3	B4	B5
0	-	-	-	-	-
10	$1,50 \cdot 10^{-4}$ M (qu.)#				
600				$1,37 \cdot 10^{-5}$ M (9.1 %)	
1200				$2,40 \cdot 10^{-5}$ M (16 %)	
1800	$1,50 \cdot 10^{-4}$ M (qu.)			$3,61 \cdot 10^{-5}$ M (24 %)	
3600				$6,04 \cdot 10^{-5}$ M (40 %)	
7200	$1,50 \cdot 10^{-4}$ M (qu.)	$2,70 \cdot 10^{-5}$ M (18 %)	$1,64 \cdot 10^{-5}$ M (11 %)	$9,18 \cdot 10^{-5}$ M (61 %)	-
14400		$4,06 \cdot 10^{-5}$ M (27 %)	$2,63 \cdot 10^{-5}$ M (18 %)		-
18000		$4,56 \cdot 10^{-5}$ M (30 %)	$3,28 \cdot 10^{-5}$ M (22 %)	$1,25 \cdot 10^{-4}$ M (83 %)	
28800		$5,98 \cdot 10^{-5}$ M (40 %)	$4,59 \cdot 10^{-5}$ M (31 %)		-
50400		$7,91 \cdot 10^{-5}$ M (53 %)	$6,58 \cdot 10^{-5}$ M (44 %)		
86400	$1,50 \cdot 10^{-4}$ M (qu.)	$9,26 \cdot 10^{-5}$ M (62 %)	$8,55 \cdot 10^{-5}$ M (57 %)	$1,50 \cdot 10^{-4}$ M (qu.)	-
172800					$1,50 \cdot 10^{-6}$ M (1.0%)*

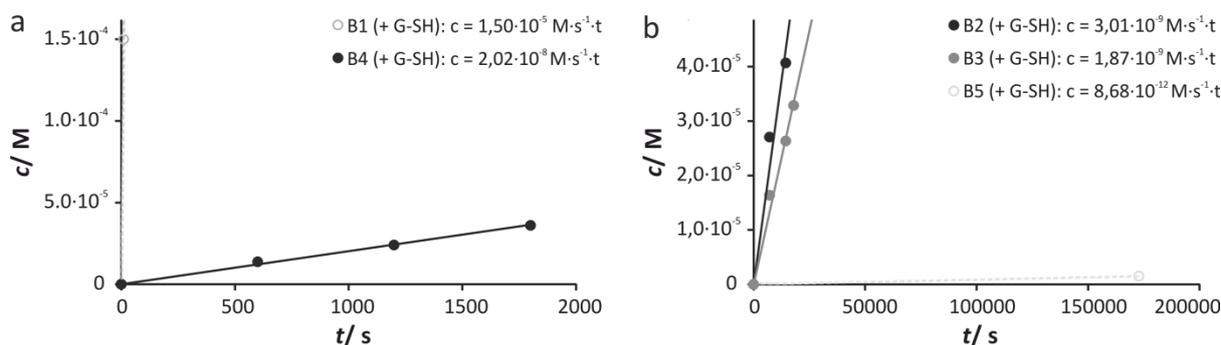


Abbildung 79: Graphen, die aus den Ausbeuten η der Reaktionen mit **GSH** resultieren. **a** **B1** und **B4** und **b** **B2**, **B3** und **B5** in Gegenwart von **GSH**. Die Steigungen der linearen Ausgleichsgeraden korrespondieren zu den Anfangsgeschwindigkeiten.

Rohdaten zu den Verknüpfungsreaktionen mit B4

Tabelle 36: Produktkonzentrationen in M und Ausbeuten η in % der Reaktion von **B4** in Gegenwart von Proteintemplat (+T) bei pH 7,4, 8,4 und 9,4, die aus der Integration der HPLC-Signale resultieren. Die schwarzen Werte wurden zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeiten verwendet. qu. = quantitativer Umsatz, d. h. Peptid **B4** war zum jeweiligen Messzeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Für Details siehe Kapitel 5.10.1, 'Prozessierung der kinetischen Daten'.

t / s	mit Proteintemplat (+T)		
	pH 7,4	pH 8,4	pH 9,4
0	-	-	-
300	$1,00 \cdot 10^{-6}$ M (5.0 %)	$4,55 \cdot 10^{-6}$ M (23 %)	$8,89 \cdot 10^{-6}$ M (44 %)
600	$2,22 \cdot 10^{-6}$ M (11 %)	$8,12 \cdot 10^{-6}$ M (41 %)	$1,26 \cdot 10^{-5}$ M (63 %)
1200	$4,28 \cdot 10^{-6}$ M (21 %)	$1,19 \cdot 10^{-5}$ M (59 %)	$1,54 \cdot 10^{-5}$ M (77 %)
1800	$5,96 \cdot 10^{-6}$ M (30 %)	$1,44 \cdot 10^{-5}$ M (72 %)	$1,75 \cdot 10^{-5}$ M (87 %)
3600	$1,03 \cdot 10^{-5}$ M (51 %)	$1,84 \cdot 10^{-5}$ M (92 %)	$2,00 \cdot 10^{-5}$ M (qu.)
5400	$1,30 \cdot 10^{-5}$ M (65 %)	$2,00 \cdot 10^{-5}$ M (qu.)	$2,00 \cdot 10^{-5}$ M (qu.)
10800	$1,62 \cdot 10^{-5}$ M (81 %)	$2,00 \cdot 10^{-5}$ M (qu.)	$2,00 \cdot 10^{-5}$ M (qu.)

Tabelle 37: Produktkonzentrationen in M und Ausbeuten η in % der Reaktion von **B4** in Abwesenheit von Proteintemplat (-T) bei pH 7,4, 8,4 und 9,4, die aus der Integration der HPLC-Signale resultieren. * = Basierend auf der Nachweisgrenze der HPLC wurde dieser Wert als obere Grenze zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit verwendet. Für Details siehe Kapitel 5.10.1, 'Prozessierung der kinetischen Daten'.

t / s	ohne Proteintemplat (-T)		
	pH 7,4	pH 8,4	pH 9,4
0	-	-	-
86400	$1,20 \cdot 10^{-6}$ M (6.0 %)*	$2,61 \cdot 10^{-6}$ M (13 %)	$3,81 \cdot 10^{-6}$ M (19 %)

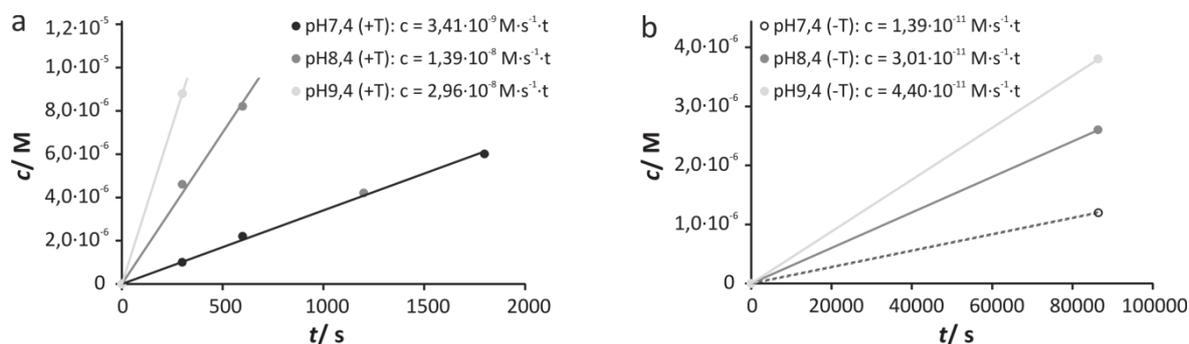


Abbildung 80: Graphen, die aus den Ausbeuten η der Reaktionen von **B4** bei pH 7,4, 8,4 und 9,4 a) in Gegenwart von Proteintemplat (+T) und b) in Abwesenheit von Proteintemplat (-T) resultieren. Die Steigungen der linearen Ausgleichsgeraden korrespondieren zu den Anfangsgeschwindigkeiten.

Rohdaten zu den Verknüpfungsreaktionen mit B1

Tabelle 38: Produktkonzentrationen in M und Ausbeuten η in % der Reaktion von **B1** in Gegenwart von Proteintemplat (+T) bei pH 4,4, 5,9 und 7,4, die aus der Integration der HPLC-Signale resultieren. Die schwarzen Werte wurden zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeiten verwendet. # = Dieser Wert wurde als untere Grenze zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit verwendet. Für Details siehe Kapitel 5.10.1, Prozessierung der kinetischen Daten'.

t / s	mit Proteintemplat (+T)		
	pH 4,4	pH 5,9	pH 7,4
0	-	-	-
5	$7,81 \cdot 10^{-7}$ M (16 %)	$2,98 \cdot 10^{-6}$ M (60 %)[#]	$3,68 \cdot 10^{-6}$ M (74 %)[#]
15	$1,97 \cdot 10^{-6}$ M (39 %)	$3,32 \cdot 10^{-6}$ M (67 %)	$4,13 \cdot 10^{-6}$ M (83 %)
30	$2,66 \cdot 10^{-6}$ M (53 %)	$3,68 \cdot 10^{-6}$ M (74 %)	$4,14 \cdot 10^{-6}$ M (83 %)
50			$4,58 \cdot 10^{-6}$ M (92 %)
180	$3,30 \cdot 10^{-6}$ M (66 %)	$4,94 \cdot 10^{-6}$ M (99 %)	

Tabelle 39: Produktkonzentrationen in M und Ausbeuten η in % der Reaktion von **B1** in Abwesenheit von Proteintemplat (-T) bei pH 4,4, 5,9 und 7,4, die aus der Integration der HPLC-Signale resultieren. Die schwarzen Werte wurden zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeiten verwendet. Für Details siehe Kapitel 5.10.1, Prozessierung der kinetischen Daten'.

t / s	ohne Proteintemplat (-T)		
	pH 4,4	pH 5,9	pH 7,4
0	-	-	-
50			$3,01 \cdot 10^{-7}$ M (6.0 %)
180			$9,62 \cdot 10^{-7}$ M (19 %)
1800		$7,79 \cdot 10^{-7}$ M (16 %)	$3,82 \cdot 10^{-6}$ M (76 %)
21600	$4,69 \cdot 10^{-7}$ M (9.4 %)		
86400	$2,23 \cdot 10^{-6}$ M (45 %)		

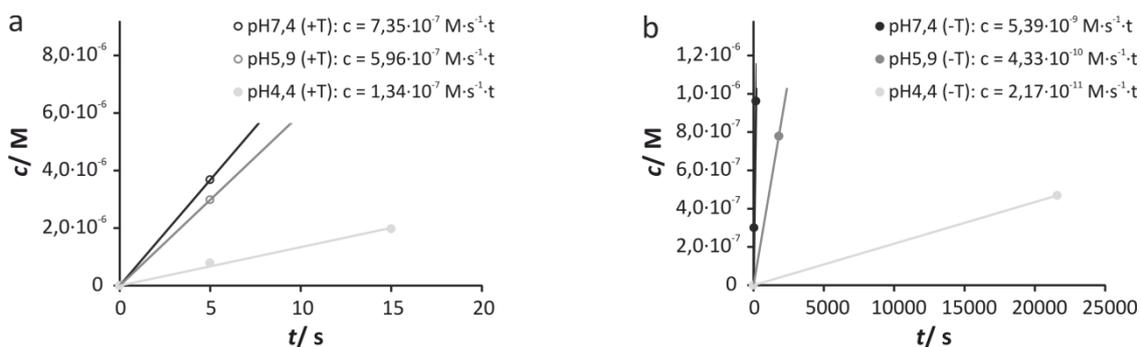


Abbildung 81: Graphen, die aus den Ausbeuten η der Reaktionen von **B1** bei pH 7,4, 5,9 und 4,4 a in Gegenwart von Proteintemplat (+T) und b in Abwesenheit von Proteintemplat (-T) resultieren. Die Steigungen der linearen Ausgleichsgeraden korrespondieren zu den Anfangsgeschwindigkeiten.

Rohdaten zu den Transferreaktionen zwischen A5 und D*

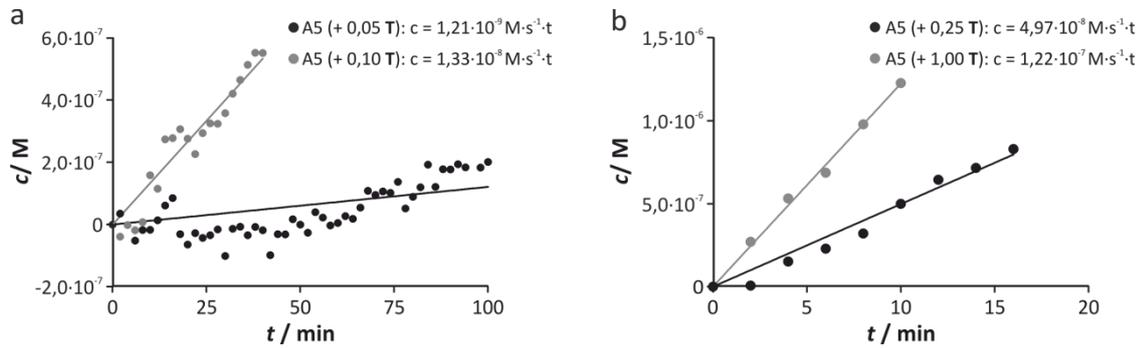


Abbildung 82: Graphen, die aus den Ausbeuten η der Reaktionen von **A5** und **D*** mit a 0,05 Äq. **T** (grau) bzw. 0,1 Äq. **T** (schwarz) und b mit a 0,25 Äq. **T** (grau) bzw. 1 Äq. **T** (schwarz) resultieren. Die Steigungen der linearen Ausgleichsgeraden korrespondieren zu den Anfangsgeschwindigkeiten. Die verwendeten Datenpunkte sind in der Tabelle 40 angegeben.

Rohdaten zu den Transferreaktionen zwischen A6 und D*

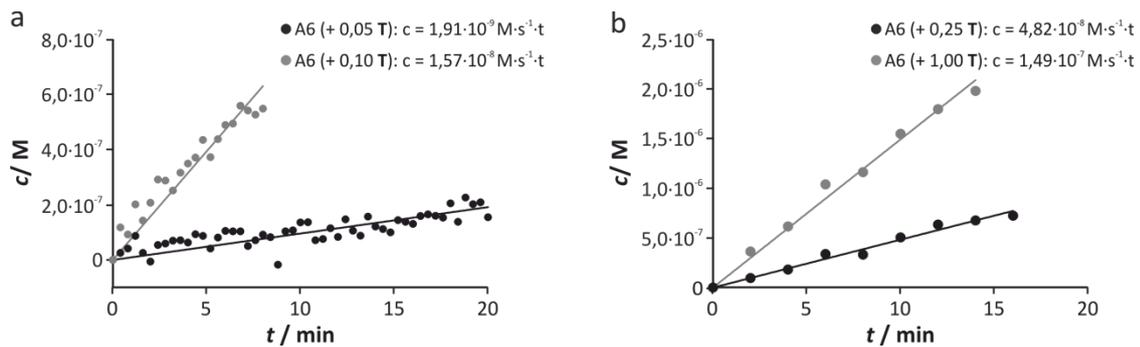


Abbildung 83: Graphen, die aus den Ausbeuten η der Reaktionen von **A6** und **D*** mit a 0,05 Äq. **T** (grau) bzw. 0,1 Äq. **T** (schwarz) und b mit a 0,25 Äq. **T** (grau) bzw. 1 Äq. **T** (schwarz) resultieren. Die Steigungen der linearen Ausgleichsgeraden korrespondieren zu den Anfangsgeschwindigkeiten. Die verwendeten Datenpunkte sind in der Tabelle 40 angegeben.

Rohdaten zu den Transferreaktionen zwischen D* und A5 bzw. A6

Tabelle 40: Produktkonzentrationen in M der Reaktionen von A5 (links) und A6 (rechts) mit D* in Gegenwart von substöchiometrischen Mengen T (0,05 Äq, 0,1 Äq, 0,25 Äq und 1 Äq.) bei 7,4 und 30 °C, die aus den Intensitäten der Fluoreszenzlöschung resultieren. Die schwarzen Werte wurden zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeiten verwendet. Für Details siehe Kapitel 5.10.2, 'Prozessierung der kinetischen Daten'.

t / min	A5 + D*				A6 + D*			
	0,05 Äq. T	0,10 Äq. T	0,25 Äq. T	1,00 Äq. T	0,05 Äq. T	0,10 Äq. T	0,25 Äq. T	1,00 Äq. T
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6,94·10 ⁻³	-7,80·10 ⁻³	1,35·10 ⁻³	5,42·10 ⁻²	5,17·10 ⁻³	2,35·10 ⁻²	2,00·10 ⁻²	7,27·10 ⁻²
4	-5,90·10 ⁻⁴	-2,81·10 ⁻⁴	3,04·10 ⁻²	1,06·10 ⁻¹	8,27·10 ⁻³	1,85·10 ⁻²	3,64·10 ⁻²	1,23·10 ⁻¹
6	-1,03·10 ⁻²	-3,71·10 ⁻³	4,59·10 ⁻²	1,37·10 ⁻¹	1,74·10 ⁻²	4,02·10 ⁻²	6,78·10 ⁻²	2,08·10 ⁻¹
8	-3,53·10 ⁻³	1,53·10 ⁻³	6,42·10 ⁻²	1,96·10 ⁻¹	5,09·10 ⁻³	2,85·10 ⁻²	6,65·10 ⁻²	2,32·10 ⁻¹
10	-3,43·10 ⁻³	3,16·10 ⁻²	9,99·10 ⁻²	2,45·10 ⁻¹	-1,13·10 ⁻³	4,15·10 ⁻²	1,01·10 ⁻¹	3,09·10 ⁻¹
12	2,78·10 ⁻³	2,30·10 ⁻²	1,29·10 ⁻¹	2,87·10 ⁻¹	1,08·10 ⁻²	5,83·10 ⁻²	1,27·10 ⁻¹	3,59·10 ⁻¹
14	1,22·10 ⁻²	5,47·10 ⁻²	1,43·10 ⁻¹	3,42·10 ⁻¹	1,19·10 ⁻²	5,75·10 ⁻²	1,35·10 ⁻¹	3,96·10 ⁻¹
16	1,70·10 ⁻²	5,56·10 ⁻²	1,66·10 ⁻¹	3,68·10 ⁻¹	1,40·10 ⁻²	5,03·10 ⁻²	1,45·10 ⁻¹	4,39·10 ⁻¹
18	-6,21·10 ⁻³	6,12·10 ⁻²	1,77·10 ⁻¹	3,94·10 ⁻¹	1,42·10 ⁻²	6,32·10 ⁻²	1,69·10 ⁻¹	4,73·10 ⁻¹
20	-1,29·10 ⁻²	5,51·10 ⁻²	1,87·10 ⁻¹	4,11·10 ⁻¹	1,27·10 ⁻²	6,98·10 ⁻²	1,77·10 ⁻¹	5,04·10 ⁻¹
22	-5,55·10 ⁻³	4,53·10 ⁻²	2,15·10 ⁻¹	4,28·10 ⁻¹	1,87·10 ⁻²	7,42·10 ⁻²	2,03·10 ⁻¹	5,40·10 ⁻¹
24	-8,61·10 ⁻³	5,87·10 ⁻²	2,27·10 ⁻¹	4,61·10 ⁻¹	1,75·10 ⁻²	8,69·10 ⁻²	2,19·10 ⁻¹	5,65·10 ⁻¹
26	-6,92·10 ⁻³	6,50·10 ⁻²	2,36·10 ⁻¹	5,02·10 ⁻¹	8,26·10 ⁻³	7,44·10 ⁻²	2,36·10 ⁻¹	5,86·10 ⁻¹
28	-3,09·10 ⁻³	6,48·10 ⁻²	2,46·10 ⁻¹	5,17·10 ⁻¹	1,62·10 ⁻²	8,75·10 ⁻²	2,41·10 ⁻¹	6,04·10 ⁻¹
30	-2,02·10 ⁻²	7,15·10 ⁻²	2,64·10 ⁻¹	5,69·10 ⁻¹	2,10·10 ⁻²	9,77·10 ⁻²	2,64·10 ⁻¹	6,45·10 ⁻¹
32	-2,79·10 ⁻³	8,40·10 ⁻²	2,82·10 ⁻¹	5,65·10 ⁻¹	2,07·10 ⁻²	9,87·10 ⁻²	2,74·10 ⁻¹	6,47·10 ⁻¹
34	-1,35·10 ⁻³	9,28·10 ⁻²	2,90·10 ⁻¹	5,93·10 ⁻¹	2,07·10 ⁻²	1,12·10 ⁻¹	2,91·10 ⁻¹	6,71·10 ⁻¹
36	-6,92·10 ⁻³	1,03·10 ⁻¹	3,02·10 ⁻¹	6,19·10 ⁻¹	1,01·10 ⁻²	1,08·10 ⁻¹	2,89·10 ⁻¹	6,80·10 ⁻¹
38	-1,52·10 ⁻³	1,10·10 ⁻¹	3,14·10 ⁻¹	6,27·10 ⁻¹	1,42·10 ⁻²	1,05·10 ⁻¹	3,02·10 ⁻¹	6,91·10 ⁻¹
40	-3,69·10 ⁻³	1,10·10 ⁻¹	3,28·10 ⁻¹	6,51·10 ⁻¹	1,83·10 ⁻²	1,10·10 ⁻¹	3,24·10 ⁻¹	6,98·10 ⁻¹
42	-1,97·10 ⁻²	1,26·10 ⁻¹	3,35·10 ⁻¹	6,55·10 ⁻¹	1,65·10 ⁻²	1,12·10 ⁻¹	3,25·10 ⁻¹	7,22·10 ⁻¹
44	-6,19·10 ⁻³	1,18·10 ⁻¹	3,50·10 ⁻¹	6,69·10 ⁻¹	-3,42·10 ⁻³	1,02·10 ⁻¹	3,25·10 ⁻¹	7,23·10 ⁻¹
46	-6,36·10 ⁻³	1,20·10 ⁻¹	3,52·10 ⁻¹	6,91·10 ⁻¹	2,08·10 ⁻²	1,29·10 ⁻¹	3,38·10 ⁻¹	7,43·10 ⁻¹
48	3,44·10 ⁻³	1,41·10 ⁻¹	3,79·10 ⁻¹	7,00·10 ⁻¹	2,15·10 ⁻²	1,23·10 ⁻¹	3,53·10 ⁻¹	7,43·10 ⁻¹
50	-1,64E-05	1,37·10 ⁻¹	3,86·10 ⁻¹	7,26·10 ⁻¹	2,72·10 ⁻²	1,38·10 ⁻¹	3,63·10 ⁻¹	7,58·10 ⁻¹
52	-5,30·10 ⁻³	1,36·10 ⁻¹	4,02·10 ⁻¹	7,25·10 ⁻¹	2,73·10 ⁻²	1,35·10 ⁻¹	3,82·10 ⁻¹	7,75·10 ⁻¹
54	7,93·10 ⁻³	1,47·10 ⁻¹	3,95·10 ⁻¹	7,30·10 ⁻¹	1,42·10 ⁻²	1,39·10 ⁻¹	3,80·10 ⁻¹	7,77·10 ⁻¹
56	4,52·10 ⁻³	1,56·10 ⁻¹	4,13·10 ⁻¹	7,40·10 ⁻¹	1,52·10 ⁻²	1,35·10 ⁻¹	3,88·10 ⁻¹	7,84·10 ⁻¹
58	-6,23·10 ⁻⁴	1,58·10 ⁻¹	4,20·10 ⁻¹	7,49·10 ⁻¹	2,29·10 ⁻²	1,42·10 ⁻¹	3,98·10 ⁻¹	7,79·10 ⁻¹
60	9,56·10 ⁻⁴	1,64·10 ⁻¹	4,30·10 ⁻¹	7,58·10 ⁻¹	1,67·10 ⁻²	1,45·10 ⁻¹	3,97·10 ⁻¹	7,96·10 ⁻¹
62	5,36·10 ⁻³	1,68·10 ⁻¹	4,42·10 ⁻¹	7,66·10 ⁻¹	2,95·10 ⁻²	1,47·10 ⁻¹	4,10·10 ⁻¹	7,95·10 ⁻¹
64	3,72·10 ⁻³	1,72·10 ⁻¹	4,42·10 ⁻¹	7,66·10 ⁻¹	2,12·10 ⁻²	1,65·10 ⁻¹	4,09·10 ⁻¹	8,05·10 ⁻¹
66	1,09·10 ⁻²	1,75·10 ⁻¹	4,55·10 ⁻¹	7,67·10 ⁻¹	1,76·10 ⁻²	1,59·10 ⁻¹	4,15·10 ⁻¹	8,01·10 ⁻¹
68	2,16·10 ⁻²	1,88·10 ⁻¹	4,90·10 ⁻¹	7,97·10 ⁻¹	3,14·10 ⁻²	1,66·10 ⁻¹	4,26·10 ⁻¹	8,22·10 ⁻¹
70	1,91·10 ⁻²	1,90·10 ⁻¹	4,75·10 ⁻¹	7,94·10 ⁻¹	2,42·10 ⁻²	1,64·10 ⁻¹	4,32·10 ⁻¹	8,15·10 ⁻¹

t / min	A5 + D*				A6 + D*			
	0,05 Äq. T	0,10 Äq. T	0,25 Äq. T	1,00 Äq. T	0,05 Äq. T	0,10 Äq. T	0,25 Äq. T	1,00 Äq. T
72	$2,13 \cdot 10^{-2}$	$1,97 \cdot 10^{-1}$	$4,90 \cdot 10^{-1}$	$8,00 \cdot 10^{-1}$	$2,24 \cdot 10^{-2}$	$1,55 \cdot 10^{-1}$	$4,28 \cdot 10^{-1}$	$8,19 \cdot 10^{-1}$
74	$2,04 \cdot 10^{-2}$	$2,04 \cdot 10^{-1}$	$4,92 \cdot 10^{-1}$	$7,97 \cdot 10^{-1}$	$2,00 \cdot 10^{-2}$	$1,69 \cdot 10^{-1}$	$4,42 \cdot 10^{-1}$	$8,24 \cdot 10^{-1}$
76	$2,73 \cdot 10^{-2}$	$2,11 \cdot 10^{-1}$	$5,04 \cdot 10^{-1}$	$8,12 \cdot 10^{-1}$	$2,88 \cdot 10^{-2}$	$1,69 \cdot 10^{-1}$	$4,58 \cdot 10^{-1}$	$8,32 \cdot 10^{-1}$
78	$1,03 \cdot 10^{-2}$	$2,13 \cdot 10^{-1}$	$5,07 \cdot 10^{-1}$	$8,15 \cdot 10^{-1}$	$2,76 \cdot 10^{-2}$	$1,80 \cdot 10^{-1}$	$4,66 \cdot 10^{-1}$	$8,36 \cdot 10^{-1}$
80	$1,78 \cdot 10^{-2}$	$2,19 \cdot 10^{-1}$	$5,14 \cdot 10^{-1}$	$8,18 \cdot 10^{-1}$	$2,62 \cdot 10^{-2}$	$1,90 \cdot 10^{-1}$	$4,55 \cdot 10^{-1}$	$8,44 \cdot 10^{-1}$
82	$2,39 \cdot 10^{-2}$	$2,10 \cdot 10^{-1}$	$5,37 \cdot 10^{-1}$	$8,25 \cdot 10^{-1}$	$3,18 \cdot 10^{-2}$	$1,83 \cdot 10^{-1}$	$4,65 \cdot 10^{-1}$	$8,30 \cdot 10^{-1}$
84	$3,85 \cdot 10^{-2}$	$2,30 \cdot 10^{-1}$	$5,37 \cdot 10^{-1}$	$8,25 \cdot 10^{-1}$	$3,31 \cdot 10^{-2}$	$1,79 \cdot 10^{-1}$	$4,67 \cdot 10^{-1}$	$8,41 \cdot 10^{-1}$
86	$2,42 \cdot 10^{-2}$	$2,34 \cdot 10^{-1}$	$5,41 \cdot 10^{-1}$	$8,42 \cdot 10^{-1}$	$3,19 \cdot 10^{-2}$	$1,78 \cdot 10^{-1}$	$4,75 \cdot 10^{-1}$	$8,42 \cdot 10^{-1}$
88	$3,56 \cdot 10^{-2}$	$2,31 \cdot 10^{-1}$	$5,50 \cdot 10^{-1}$	$8,36 \cdot 10^{-1}$	$3,06 \cdot 10^{-2}$	$1,83 \cdot 10^{-1}$	$4,81 \cdot 10^{-1}$	$8,49 \cdot 10^{-1}$
90	$3,54 \cdot 10^{-2}$	$2,33 \cdot 10^{-1}$	$5,55 \cdot 10^{-1}$	$8,43 \cdot 10^{-1}$	$4,10 \cdot 10^{-2}$	$1,85 \cdot 10^{-1}$	$4,81 \cdot 10^{-1}$	$8,55 \cdot 10^{-1}$
92	$3,87 \cdot 10^{-2}$	$2,37 \cdot 10^{-1}$	$5,60 \cdot 10^{-1}$	$8,51 \cdot 10^{-1}$	$2,77 \cdot 10^{-2}$	$1,91 \cdot 10^{-1}$	$4,83 \cdot 10^{-1}$	$8,55 \cdot 10^{-1}$
94	$3,68 \cdot 10^{-2}$	$2,49 \cdot 10^{-1}$	$5,72 \cdot 10^{-1}$	$8,51 \cdot 10^{-1}$	$4,52 \cdot 10^{-2}$	$1,93 \cdot 10^{-1}$	$4,99 \cdot 10^{-1}$	$8,75 \cdot 10^{-1}$
96	$4,63 \cdot 10^{-2}$	$2,56 \cdot 10^{-1}$	$5,85 \cdot 10^{-1}$	$8,56 \cdot 10^{-1}$	$4,03 \cdot 10^{-2}$	$1,95 \cdot 10^{-1}$	$4,98 \cdot 10^{-1}$	$8,58 \cdot 10^{-1}$
98	$3,66 \cdot 10^{-2}$	$2,53 \cdot 10^{-1}$	$5,76 \cdot 10^{-1}$	$8,65 \cdot 10^{-1}$	$4,17 \cdot 10^{-2}$	$2,02 \cdot 10^{-1}$	$5,02 \cdot 10^{-1}$	$8,64 \cdot 10^{-1}$
100	$4,02 \cdot 10^{-2}$	$2,62 \cdot 10^{-1}$	$5,88 \cdot 10^{-1}$	$8,66 \cdot 10^{-1}$	$3,09 \cdot 10^{-2}$	$2,02 \cdot 10^{-1}$	$5,00 \cdot 10^{-1}$	$8,70 \cdot 10^{-1}$