

Bioorthogonale Reaktionen durch C^α-Formylglycin-generierende Enzyme

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

vorgelegt von
Marcus Gerlach
aus Duderstadt

Organische und Bioorganische Chemie
Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

Bielefeld 2016

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier im Sinne von DIN-ISO 9706.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald
in der Zeit von Oktober 2012 bis Dezember 2016
an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald - Organische Chemie III
Fakultät für Chemie Universität Bielefeld

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dierks - Biochemie I
Fakultät für Chemie Universität Bielefeld

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald für die interessante Aufgabenstellung und die Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Betreuung der biochemischen Aufgabenstellungen. Vielen Dank für die spannenden und inspirierenden Diskussionen.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen OC III und BC I danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Speziell möchte ich mich bedanken bei:

Dr. Michael Höfener für seine gute Laune im Labor, die Hilfestellung bei Synthesen und die Einführung in den Boßelsport.

Dr. Marcel Frese für eine schöne gemeinsame Studienzeit und die wissenschaftliche Beratung während dieser Phase.

M.Sc. Matthias Wünsch für die Nachhilfe bei chemischen Fragestellungen und *trash TV*.

Dr. Eva C. Ennemann für die Einarbeitung in die Insektenzellkultur und Kostproben Northofer Spezialitäten.

Dr. Michaela Wachs für die vielen anregenden Diskussionen rund um das Thema FGE und der Einführung des *Schott bottle* Trainings.

Dr. Olaf Barton danke ich für die tägliche Portion Wahnsinn im Labor.

Kerstin Böker für die entspannten Kaffeepausen und Ratschlägen für alle Lebenslagen.

Prof. Dr. Kristian Müller und M. Sc. Georg Falck danke ich für die gute Kooperation und Zusammenarbeit während dieser Arbeit und für die hilfreichen Tipps und Anregungen zu den Antikörperfragmenten.

Vielen Dank an die „Tobis“ für die gute Zusammenarbeit.

Für die tatkräftige Unterstützung und engagierte Mitarbeit im Rahmen von Praktika danke ich: Tobias Beuel, Lars Rüdebusch, Marvin Linnemannstöns, Marcel Schmidt, Tobias Krüger, Jana Löwe und Nicolai Montua. Insbesondere möchte ich mich bei meiner Auszubildenden Annalena Lausch für ihre Einsatzbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Freunden und Kommilitonen danke ich für die schöne Studienzeit und die gute Zusammenarbeit in den Laborpraktika, Vorlesungen und während der Promotion.

Zum Abschluss dieser Arbeit und meines Studiums möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern für die Unterstützung bedanken, auch dafür, dass sie meine Entscheidungen stets uneingeschränkt respektiert und unterstützt haben. Danke, dass ihr trotz schlechter Noten in Latein und Kunst immer an mich geglaubt habt!

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	9
2.1 Reaktionen für die Peptid- und Proteinkonjugation	9
2.1.1 Proteinogene Aminosäuren für Konjugationsreaktionen.....	9
2.1.2 Unnatürliche Aminosäuren für Konjugationsreaktionen.....	10
2.1.3 Enzymatische Modifizierungen für Konjugationsreaktionen.....	11
2.2 C ^α -Formylglycin.....	13
2.3 Das Formylglycin-generierende Enzym	14
2.3.1 Struktur des humanen Formylglycin-generierenden Enzyms	14
2.3.2 Struktur des prokaryotischen Formylglycin-generierenden Enzyms	15
2.3.3 Katalytische Aktivität des Formylglycin-generierenden Enzyms.....	17
2.3.4 Konsensussequenz für die FGly-Konversion	20
2.4 Das Radikal-SAM-Protein AtsB.....	22
2.5 Methoden für die Bioorthogonale Konjugation mit C ^α -Formylglycin.....	22
2.5.1 Die Oxim- und Hydrazon-Ligation.....	22
2.5.2 Die Wittig-Reaktion	23
2.5.3 Die Pictet-Spengler-Reaktion.....	24
2.5.4 Die Knoevenagel-Ligation	26
2.6 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate in der Tumor Therapie.....	27
2.6.1 Das Formylglycin-generierende Enzym für die Produktion von ADCs	28
2.6.2 EGFR als Antigen für FGly-Antikörper-Wirkstoff-Konjugate	29
3. Zielsetzung	33
4. Material	35
5. Experimenteller Teil	49
5.1 Chemische Arbeiten	49
5.1.1 Allgemeines.....	49

5.1.2	Synthese der Polyethylenglycol-Linker.....	52
5.1.3	Synthese der Affinitätsgruppe für die HIPS-Ligation	58
5.1.4	Synthese der Affinitätsgruppe für die <i>trapped</i> -Knoevenagel Ligation	67
5.1.5	Synthese von Fluorophoren als Reportergruppe.....	74
5.1.6	Synthese der HIPS-Fluorophor Bausteine.....	79
5.1.7	Synthese von stabilisierten Yliden.....	84
5.1.8	Synthese von Peptiden	86
5.1.9	Synthese von Aldehyd-Peptiden.....	89
5.1.10	Wittig-Reaktionen mit Aldehyd-Peptiden	90
5.2	Biochemische Arbeiten	93
5.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	93
5.2.2	Kultivierung von Bakterien.....	95
5.2.3	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	97
5.2.4	Kultivierung von Insektenzellen	97
5.2.5	Biochemische Methoden.....	99
6.	Ergebnisse und Diskussion	111
6.1	Synthesen	111
6.1.1	Synthese von Cysteinhaltigen Substratpeptiden.....	112
6.1.2	Synthese von PEG-Linkern für die Konjugation mit FGly.....	114
6.1.3	Hydrazino- <i>iso</i> -Pictet-Spengler-Ligation für die Konjugation mit FGly	119
6.1.4	Knoevenagel-Konjugation für die Ligation mit FGly	122
6.1.5	Synthese von Fluorophoren	124
6.1.6	Synthese von Fluorophor-Bausteinen für die FGly-Konjugation	127
6.1.7	Synthese von Bausteinen für die Immobilisierung von FGE	132
6.1.8	Synthese von stabilisierten Yliden.....	134
6.2	Darstellung von aldehydhaltigen Peptiden	136
6.2.1	Expression und Reinigung von C ^α -Formylglycin-generierenden Enzymen	136
6.2.2	Evaluierung von ΔFGE und mtbFGE für die Synthese aldehydhaltiger Peptide.....	149
6.2.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen von mtbFGE.....	155
6.2.4	<i>M. tuberculosis</i> FGE in der Peptidsynthese.....	163

6.2.5	Immobilisierung von <i>M. tuberculosis</i> FGE.....	166
6.2.6	Charakterisierung der aldehydhaltigen Peptide	173
6.2.7	Wittig-Reaktionen mit aldehydhaltigen Peptiden.....	180
6.3	Produktion von FGly Antikörperfragmenten.....	186
6.3.1	EGFR als Antigen für FGly-Antikörperfragmente	186
6.3.2	Biotransformation der Antikörperfragmente mit FGE.....	187
6.3.3	Konjugationsreaktionen mit den Antikörperfragmenten.....	188
6.3.4	Reinigung der scFv-425-Fc Fluorophorkonjugate	190
6.3.5	Vergleich der Biotransformation <i>in vitro</i> oder <i>in vivo</i>	191
6.3.6	Evaluation der HIPS-scFv-425-Fc Konjugate	192
7.	Ausblick.....	200
8.	Anhang	203
9.	Literaturverzeichnis.....	213

1. Zusammenfassung

Das C^α-Formylglycin-generierende Enzym (FGE) katalysiert die posttranslationale Oxidation von Cystein zu C^α-Formylglycin (FGly).^[1] Diese Enzymreaktion ermöglicht die chemoenzymatische, bioorthogonale Konjugation von Peptiden und Proteinen mit verschiedensten Substituenten.^{[2][3]} Die hohe Relevanz dieser Technik wird durch die im Zeitraum dieser Arbeit von 2012 bis 2016 erschienenen 22 Publikationen verdeutlicht. In diesen Arbeiten wurden verschiedene Anwendungen, wie die ortsspezifische Markierung, bioorthogonale Konjugation und orientierte Immobilisation von Proteinen durch den Aldehyd-*tag* beschrieben.^[4–25]

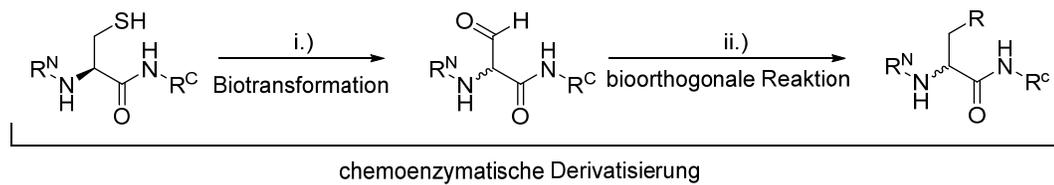


Abbildung 1-1 ChemoSelektive Derivatisierung von Peptiden und Proteinen: i.) Konversion von Cystein in den Aldehyd-*tag* durch das C^α-Formylglycin-generierende Enzym (FGE). ii.) Bioorthogonale Reaktion mit dem Aldehyd in der Seitenkette von FGly. Es konnten die Oxim-Ligation, Wittig-Reaktion, HIPS-Ligation und *trapped*-Knoevenagel-Ligation angewendet werden.

Der erste Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin, Peptide mittels FGE und folgenden selektiven Reaktionen zu derivatisieren. Es wurde untersucht, ob durch diese chemoenzymatische Synthesestrategie Peptide mit neuen funktionellen Gruppen synthetisiert werden können. Für dieses Projekt wurde zunächst die Expression und Reinigung von zwei FGE-Spezies etabliert und optimiert, da für die präparative Umsetzung von Peptiden hohe Mengen an FGE benötigt werden. Die Expression des trunkierten eukaryotischen FGE (AS 73-374, ΔFGE) gelang in *High Five* Insektenzellen. Die anschließende Reinigung über IMAC im *Batch*-Verfahren lieferte etwa 41 mg ΔFGE pro Liter Kulturmedium. Außerdem wurde das prokaryotische FGE aus *Mycobacterium tuberculosis* (AS 2-299, mtbFGE) rekombinant heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Ausbeute betrug 25 mg mtbFGE pro Liter Kulturmedium. Beide FGE-Spezies wurden auf ihre Eignung als Biokatalysatoren untersucht. Sowohl mit ΔFGE als auch mit mtbFGE wurden erfolgreich *in vitro* Modellpeptide umgesetzt. Insgesamt eignet sich mtbFGE jedoch besser für die Oxidation von Modellpeptiden *in vitro*, da die Expression in *E. coli* effizienter durchzuführen war und eine höhere *turnover number* (TON, *P*) erreicht wurde. Anschließend wurde die Aktivität von mtbFGE in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen wie pH-Wert, Reduktionsmittel, Kupfergehalt, Temperatur und dem Puffersystem bestimmt und diese soweit wie möglich optimiert. So konnte nach Anpassung der Reaktionsbedingungen, das Modellpeptid Ac-YLCTPSR-NH₂ (**70**), durch mtbFGE mit einer spezifischen Aktivität von 63.56 ± 1.68 mU/mg (n=3) *in vitro* zum Aldehyd-Peptid Ac-YL(FGly)TPSR-NH₂ (**73**) oxidiert werden.

Hierbei zeigte sich, dass die Enzymstabilität von mtbFGE der Kapazitätsengpass der Biotransformation ist. Aufgrund der schnellen Enzympräzipitation nach zwei Stunden Reaktionszeit, wurde eine geringe TON erreicht. Um die Stabilität von mtbFGE für den Umsatz von Peptiden *in vitro* zu verbessern, wurden Enzymimmobilisierungstechniken erprobt. Dazu wurden Enzymaggregate durch Glutaraldehyd quervernetzt und die Immobilisierung mit Hilfe eines Epoxid-Harzes wurde erprobt. Durch *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) oder durch die Konjugation mit einem Trägermaterial konnte in ersten Experimenten eine höhere Enzymstabilität erreicht werden. Die hierbei adressierten Lysin-Seitenketten stellten sich jedoch als unvorteilhaft heraus, da geringe Ausbeuten an Immobilisat mit einer verringerten katalytischen Aktivität erzielt wurden. Aus diesem Grund wurde die Variante mtbFGE-LCTPSR hergestellt, um die ortsgerichtete Enzymimmobilisierung durch den Aldehyd-*tag* zu realisieren. Erste Experimente zeigten, dass der Cystein-Rest während der Expression zu FGly umgesetzt wird. Infolgedessen ist die Immobilisierung durch Konjugation von FGly mit einem Trägermaterial möglich.

Nach der Biotransformation mit mtbFGE und Reinigung mittels RP-HPLC, wurden die Aldehyd-Peptide Ac-YL(FGly)TPSRAALLTGR-NH₂ (**71**), Ac-YL(FGly)TPSR-NH₂ (**72**) und Ac-YL(FGly)TPSR-NH₂ (**73**) im Milligrammaßstab isoliert. Anschließend wurde die spektroskopische Charakterisierung dieser Peptide vorgenommen. Aufgrund der Arylsulfatase A (ASA) Kristallstruktur ist bekannt, dass FGly als Aldehydhydrat vorliegen kann.^[26] Durch Massenspektrometrie wurde sowohl das Diol von FGly als auch der Aldehyd nachgewiesen, was auf ein dynamisches Gleichgewicht beider Formen schließen lässt. In folgenden Studien konnte durch IR- und NMR-Spektroskopie belegt werden, dass das Gleichgewicht in wässriger Lösung auf Seiten des geminalen Diols liegt. In organischen Lösungsmitteln kommt im Gegensatz dazu bevorzugt der Aldehyd vor. In beiden Untersuchungen konnte ebenfalls die Enol-Form von FGly nachgewiesen werden. Die Keto-Enol-Tautomerie der Aldehyd- und Enol-Form von FGly ist Ursache für die Epimerisierung am C^α-Kohlenstoffatom. Weil es sich bei FGly um eine 1,3-Dicarbonylverbindung handelt, scheint dies unvermeidbar.

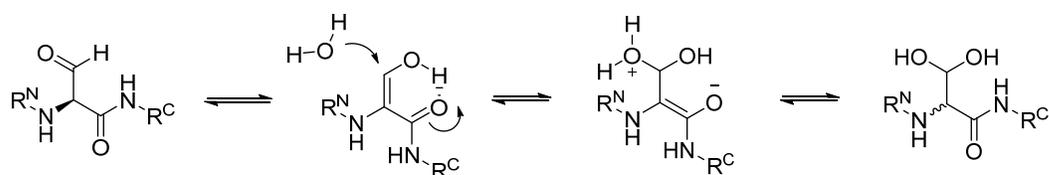


Abbildung 1-2 Postulierter Mechanismus der Racemisierung durch die Keto-Enol-Tautomerie von FGly, basierend auf der spektroskopischen Charakterisierung der Aldehyd-Peptide.

Das nächste Projekt dieser Arbeit bestand in der selektiven Funktionalisierung von FGly durch die Wittig-Reaktion mit stabilisierten Yliden. Dies führte in wässriger Lösung nur zu einem geringen Umsatz. Da ein sehr geringer Anteil von FGly als elektrophiler Aldehyd vorliegt, erfolgt die nukleophile Substitution durch das Phosphor Ylid langsamer als die Zersetzung des Ylids. Längere Reaktionszeiten führten deshalb nicht zu höheren Ausbeuten. Aufgrund des zum Aldehyd verschobenen Gleichgewichts konnte die Wittig-Reaktion erfolgreich in organischen Lösungsmitteln durchgeführt

werden. Somit eignet sich diese Reaktion für die Derivatisierung von Peptiden, jedoch nicht für Proteine. Die verwendeten organischen Lösungsmittel wie Ethanol würden zu einer Denaturierung der Proteine führen.

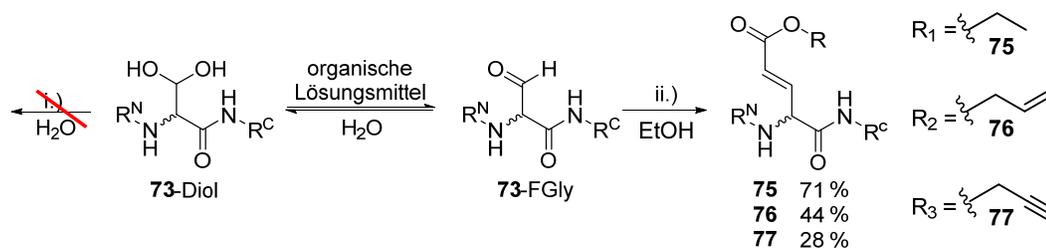


Abbildung 1-3 Derivatisierung von FGly durch Wittig-Reaktionen in Abhängigkeit vom Gleichgewicht zwischen Aldehyd- und Diol-Form. i.) Ylid **65**, **67**, **74** $\text{H}_2\text{O}/\text{tert-BuOH}$, RT Aufgrund der Gleichgewichtslage eignet sich Wasser nicht als Lösungsmittel. ii.) Ylid **65**, **67**, **74**, abs. EtOH, RT 3 h. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte die Reaktion erfolgreich in Ethanol durchgeführt werden.

Für die Konjugation mit Proteinen wird eine bioorthogonale Reaktion benötigt, welche in wässriger Lösung durchgeführt werden kann. In dieser Arbeit wurde auch die Oxim-Ligation für die Konjugation mit FGly evaluiert. Eine zufriedenstellende Umsetzung per Oxim-Ligation konnte im wässrigen jedoch aufgrund des stark zum Diol verschobenen Gleichgewichts nicht erreicht werden. Der geringe Anteil an Aldehyd führt zu einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit, als die Hydrolyse des Oxims. Mit Hydroxylamin-PEG-Linker **14** wurde ein Umsatz von bis zu 70 % erzielt. Daher eignet sich diese Reaktion nur bedingt für die Konjugation mit FGly in Proteinen.

Bei der Derivatisierung von Antikörperfragmenten mit Zytostatika werden quantitative Umsätze benötigt, damit ein homogenes Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis (DAR) erreicht wird. Daher wurde wie in Arbeiten von D. Rabuka beschrieben, die Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler-Ligation (HIPS)^[12] oder *trapped*-Knoevenagel-Ligation^[27] eingesetzt, um Proteine in wässriger Lösung mit Effektormolekülen zu funktionalisieren. Im Vergleich mit der Oxim-Ligation zeigen diese Konjugationstechniken eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei einem nahezu neutralem pH-Wert. Weiterhin wird durch diese Reaktionen eine stabile Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung mit FGly geknüpft.^{[12][27]} Beide Bausteine wurden erfolgreich synthetisiert und mit Effektormolekülen wie z. B. Fluorophoren konjugiert.

Im abschließenden Projekt dieser Arbeit wurde erfolgreich beschrieben, wie ein Cystein-Rest innerhalb des Antikörperfragmentes scFv-425-Fc mit mtbFGE *in vitro* zu FGly umgesetzt werden kann. Unter Einsatz der HIPS-Ligation konnte ein Fluorophor-Konjugat hergestellt werden. Die finale Evaluierung von HIPS-scFv-425-Fc durch *live cell imaging* zeigte, dass das Konjugat den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) bindet und daraufhin internalisiert wird.

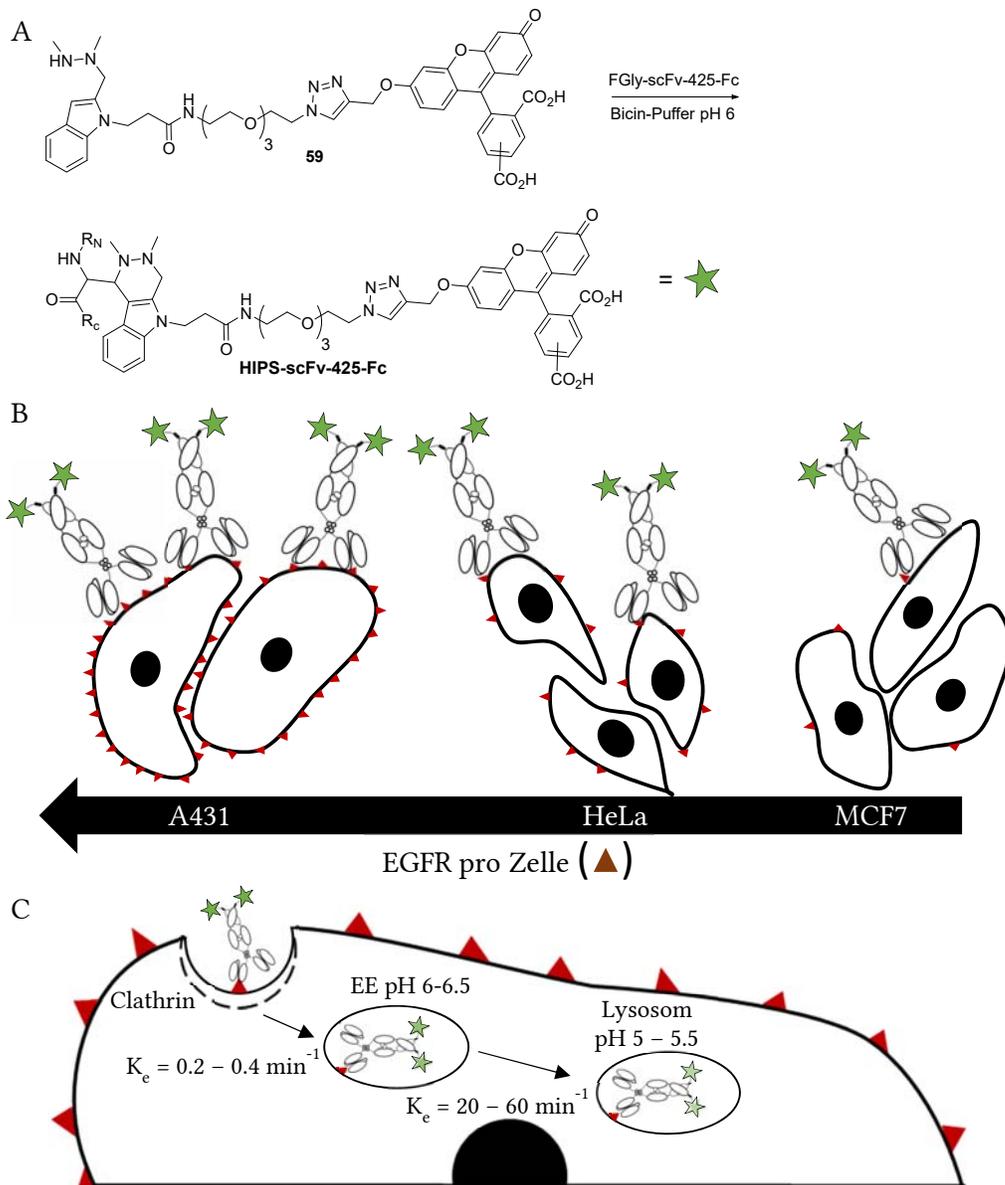


Abbildung 1-4 Synthese und Evaluierung von Fluorophor-Antikörperfragment-Konjugaten (HIPS-scFv-425-Fc): (A) Basierend auf der HIPS-Ligation wurde ein Fluorophor **59** synthetisiert, welches für die Konjugation mit FGly eingesetzt werden kann. (B) Das HIPS-scFv-425-Fc Konjugat bindet den EGFR. (C) Durch *live cell imaging* Experimente konnte gezeigt werden, wie das Konjugat internalisiert wurde. Durch den Einsatz der Zelllinien A431, HeLa und MCF7 wurde gezeigt, dass die Internalisierung mit dem Expressionslevel von EGFR zusammenhängt.

Wahrscheinlich wird HIPS-scFv-425-Fc durch Rezeptor-vermittelte Endocytose mittels Clathrin internalisiert. Mit den Zelllinien A431, HeLa und MCF7 wurde ein klarer Zusammenhang der Internalisierung mit dem Expressionslevel von EGFR gezeigt.

Summary

The C^α-formylglycine-generating enzyme (FGE) catalyzes the post-translational conversion of a cysteine residue within the consensus sequence (C-x/T-P-x/S-R), generating C^α-formylglycine.^[1] This enzymatic reaction enables a chemoenzymatic approach for bioorthogonal conjugation of peptides and proteins with synthetic molecules.^{[2][3]} The high relevance of this technique in biotechnological applications is exemplified by 22 publications by different groups between 2012 and 2016. They describe FGE for generation of aldehyde-tag followed by site-specific labeling, conjugation and enzyme immobilization.^[5-25]

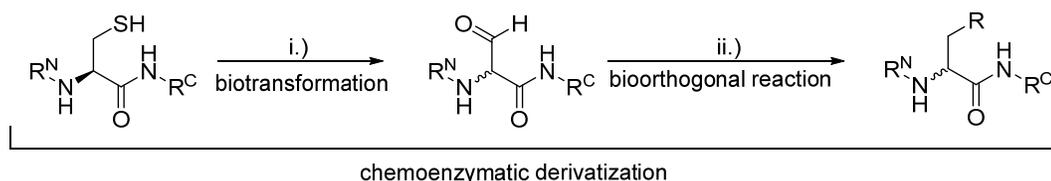


Figure 1-1 Chemoenzymatic derivatization of peptides and proteins: i.) The C^α-formylglycine-generating enzyme (FGE) is used as a biocatalyst for incorporation of aldehyde-tag into proteins and peptides, ii.) followed by a chemoselective reaction with the aldehyde residue. Oxime-ligation, Wittig-reaction, HIPS-ligation and trapped-Knoevenagel-reaction have been applied.

The first aim of this thesis was the incorporation of an aldehyde tag into peptides followed by derivatization of the FGly side chain using chemoselective reactions. It was investigated whether this chemoenzymatic approach can be used for the synthesis of peptides with new functional groups. For this purpose expression and purification of two different FGE-species were established and optimized with the focus on generating high yields of pure protein. Expression of eukaryotic FGE (AS 73-374, ΔFGE) was successfully achieved using High Five insect cells in suspension culture. After IMAC purification with a batch approach, high yields of 41 mg ΔFGE could be obtained from one liter of culture media. On the other hand, prokaryotic FGE from *Mycobacterium tuberculosis* (AS 2-299, mtbFGE) was expressed heterologously in *E. coli* with a good yield of 25 mg, obtained from one liter of culture media. Subsequently both FGE-species were evaluated regarding their applicability as a biocatalyst in peptide synthesis. For this purpose various reaction conditions such as pH value, reducing agent, copper content, temperature and buffer system were optimized. Altogether mtbFGE was more suitable for the oxidation of peptides *in vitro*, since higher turnover numbers (TON, P) have been obtained and expression in *E. coli* was the easier to handle system as well. Under conditions optimized in this study, using mtbFGE, specific activities of 63.56 ± 1.68 mU/mg (n=3) have been achieved for the peptide Ac-YLCTPSR-NH₂ (**70**). Moreover several other model peptides have also been successfully derivatized with the aldehyde-tag under these optimized conditions.

The conversion of cysteine into an aldehyde moiety on preparative scales revealed that the enzyme stability is the bottleneck of the biotransformation. After approximately two hours of reaction time, the enzyme precipitated leading to low turnover numbers. To increase stability of mtbFGE, for the conversion of cysteine-peptides *in vitro*, techniques for enzyme immobilization were tested. Chemical approaches to generate crosslinked enzyme aggregates (CLEAs) or immobilization to a solid phase using epoxide moieties proved to be successful, resulting in stabilization of the enzyme. However since a decreased catalytic activity was measured, a minor TON was achieved with these techniques in comparison to the soluble enzyme. One reason could be that lysine residues which are addressed with this immobilization techniques are not a proper choice for mtbFGE. In an alternative approach a variant of mtbFGE (mtbFGE-LCTPSR) was generated for enzyme immobilization using the aldehyde tag. Initial experiments could demonstrate that aldehyde tag is formed during expression and conjugation of catalytically active mtbFGE to a solid phase can be achieved using this moiety.

One of the limitations in FGly-dependent derivatization of biomolecules might be the isomerization of FGly moiety in solution. On the basis of crystal structure of arylsulfatase A (ASA), it is known, that hydration of FGly can result in a geminal diol.^[26] After biotransformation of cysteine-peptides with mtbFGE and purification by RP-HPLC, the peptides Ac-YL(FGly)TPSRAALLTGR-NH₂ (**71**), Ac-YL(FGly)TPSR-NH₂ (**72**) and Ac-YL(FGly)TPSR-NH₂ (**73**) could be isolated on a preparative scale with good yields. Subsequently these peptides were analyzed using mass spectrometry, IR- and NMR-spectroscopy to quantify different FGly isomers. The mass spectrometry data presented in this thesis, clearly showed that the FGly moiety exists in an dynamic equilibrium between diol and aldehyde. In follow-up studies it was successfully proven with IR- and NMR-spectroscopy that the equilibrium is shifted to the diol form of FGly in a water based solvent system. In contrast the aldehyde form is favored when organic solvents are used. In both solvent systems the enol form of FGly was detected. This keto–enol tautomerism is the reason for racemization of the C^α-carbon in the FGly-residue. Since FGly is a 1,3-dicarbonyl compound it is highly prone for racemization.

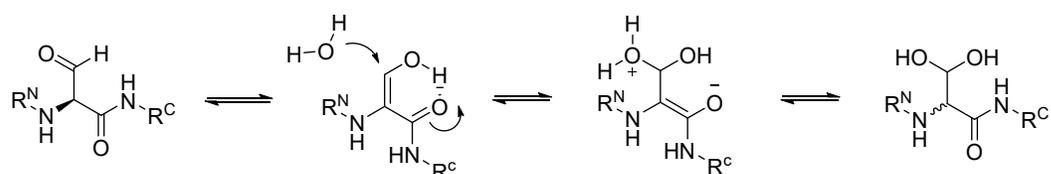


Figure 1-2 Postulated mechanism of keto–enol tautomerism of the FGly residue: The mechanism is based on the spectroscopic data collected using mass spectrometry, IR- and NMR-spectroscopy experiments.

As a potential chemoselective strategy for derivatization of the FGly side chain, Wittig-reactions with stabilized ylides have been tested. However only traces of the desired product were detected when the reaction was carried out in a water based solvent. Most likely because of the equilibrium favoring the diol form of FGly, low reaction rates were achieved. Also longer reaction times did not lead to higher yields, due to the stability of the ylides in a water based solvent. In contrast Wittig-reactions could be performed

successfully in organic solvents with good yields. Consequently these reactions are suitable for the derivatization of aldehyde-peptides because an organic solvent can be used. For the conjugation with proteins, Wittig-reactions are not suitable since a water base solvent is required to prevent protein precipitation.

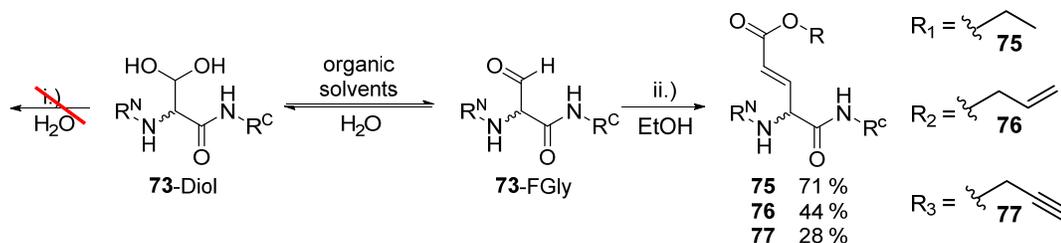


Figure 1-3 Wittig-reaction with aldehyde-peptides: i.) (Ylid **65**, **67**, **74** H₂O/*tert*-BuOH, RT) By performing the reaction in a water based solvent only traces of the desired product could be obtained, because of the unfavorable equilibrium between the aldehyde and diol form of FGly. ii.) (Ylid **65**, **67**, **74**, abs. EtOH, RT 3 h.) In contrast to this, the reaction was successful in organic solvents like ethanol.

For conjugation of proteins a chemoselective reaction is needed, which can be performed in a water based solvent. During this thesis work, oxime-ligation was tried for conjugation with FGly, but the equilibrium between aldehyde and diol resulted in low yields. Because of this unfavorable equilibrium low reaction rates have been achieved, furthermore hydrolysis of the oxime bond is possible. With hydroxylamine compound **14** conversion rates of 70 % could be accomplished. These results indicate that oxime-ligation is not the best choice for conjugation reactions with FGly. Especially for ligation of antibody fragments with cytotoxic compounds quantitative yields are important to generate a homogeneous drug to antibody ratio (DAR). Therefore, Hydrazino-*iso*-pictet-spengler-ligation (HIPS)^[12] or trapped-Knoevenagel-Ligation^[27] as described by D. Rabuka *et al.* were used for functionalization of proteins. In contrast to hydrazone and oxime ligation, these reactions proceed quickly near neutral pH and the ligation products are very stable due to carbon-carbon bond formation.^{[12][27]} Both building blocks were synthesized successfully and conjugated with functional molecules such as fluorophores.

Conversion of cysteine residues of the antibody fragment scFv-425-Fc was also successfully established in the frame of this dissertation. For generation of FGly *in vitro*, mtbFGE was used under conditions optimized in this study. Furthermore in cooperation with G. Falck, eukaryotic FGE was used in transient co-expression for incorporation of aldehyde tag. Using a newly prepared HIPS-fluorophore **59**, the FGly side chain was effectively labeled and the resulting HIPS-scFv-425-Fc conjugate was evaluated using live cell imaging. The data presented in this study, clearly demonstrates that the conjugate binds EGFR and consequently is being internalized probably via clathrin-mediated endocytosis.

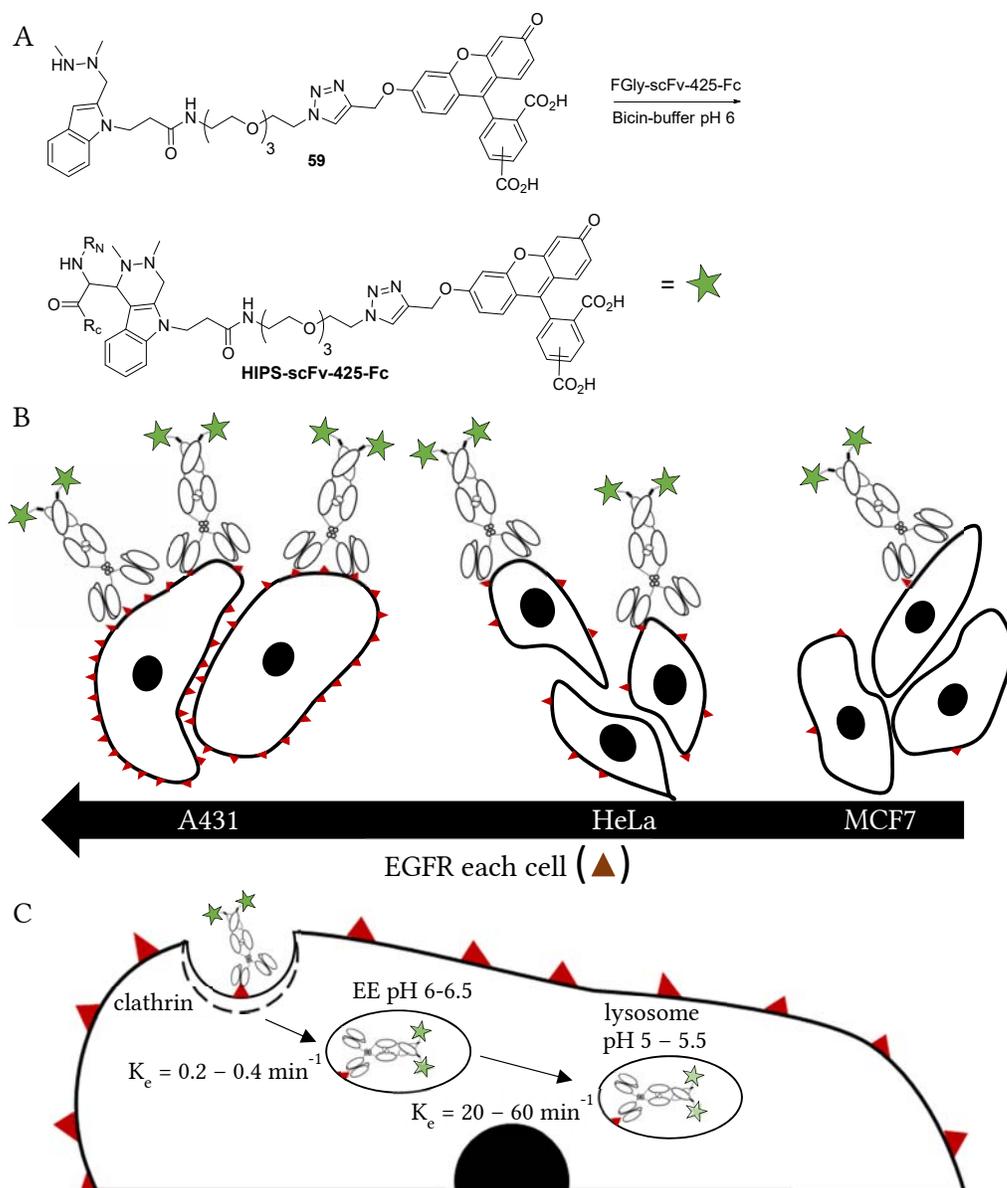


Figure 1-4 Synthesis and evaluation of fluorophore antibody fragment (HIPS-scFv-425-Fc): (A) Based on HIPS-ligation, the fluorophore building block **59** which can be used for bioorthogonal conjugation with FGly was synthesized. (B) The HIPS-scFv-425-Fc conjugate is binding to EGFR. (C) With live cell imaging experiments it has been shown, that the antibody fragment is being internalized most likely due to a clathrin-related pathway. With the cell lines A431, HeLa and MCF7 a coherence between EGFR expression and internalization could be validated.

Using the cell lines A431, HeLa and MCF7 a correlation between EGFR expression level and internalization was confirmed. This results are important for future studies on antibody-drug conjugates (ADCs) based on scFv-425-Fc.

2. Einleitung

2.1 Reaktionen für die Peptid- und Proteinkonjugation

Peptide und Proteine spielen eine zentrale Rolle in allen physiologischen Prozessen, die in lebenden Organismen stattfinden. Eine Möglichkeit, die Eigenschaften dieser Biomoleküle zu modifizieren, ist deren Konjugation mit synthetischen Molekülen.^[28] Durch die Konjugation von Proteinen mit Fluorophoren ist es möglich, deren Lokalisierung in einer Zelle oder im gesamten Organismus zu untersuchen.^[29] Mittels der gezielten Einführung von posttranslationalen Proteinmodifikationen kann dessen Funktion aufgeklärt werden. Proteinmodifikationen sind wichtig für die Steuerung der Enzymaktivität und Protein-Protein-Wechselwirkungen.^[30] Weiterhin erhöht die Glykosylierung von Proteinen ihre Löslichkeit und vermittelt Ligand-Rezeptor Interaktionen.^[31] Ein weiteres Beispiel für die hohe Relevanz von Konjugationstechniken zwischen synthetischen Molekülen und Proteinen sind die Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs).^{[32][33]} (Abschnitt 2.6)

Diese spezifischen Konjugationen im biologischen System stellen für die organische Chemie eine große Herausforderung dar. Zum einen werden chemoselektive Reaktionen benötigt, die ohne Nebenreaktionen mit anderen Aminosäureseitenketten ablaufen. Unspezifische Reaktionen können die Funktion des Proteins beeinträchtigen und erzeugen heterogene Produktgemische. Zum anderen muss die Konjugationsreaktion unter physiologischen Bedingungen ablaufen. Hohe Temperaturen, organische Lösemittel oder starke Änderungen des pH-Wertes während der Reaktion führen zur Denaturierung der Biomoleküle. Weiterhin muss die erzeugte Bindung stabil sein, da die Dissoziation des Konjugates oder eine Metabolisierung die Untersuchung unmöglich machen.^[34] Reaktionen, die diese Kriterien erfüllen, werden als bioorthogonale Reaktionen bezeichnet.^[35]

Weiterhin ist entscheidend, welche funktionelle Gruppe im Protein durch die bioorthogonale Reaktion adressiert wird. Mögliche Konjugationsstellen im Protein sind die Seitenketten der natürlichen Aminosäuren Cystein und Lysin.^[36] Zudem ist es möglich nicht-proteinogene Aminosäuren gezielt in ein Protein einzubauen.^[37] Eine dritte, häufig eingesetzte Strategie ist die Einführung von Peptidsequenzen in das Protein, welche von Enzymen erkannt werden. Durch eine Biotransformation erfolgt dann die Konjugationsreaktion oder die Erzeugung der benötigten funktionellen Gruppe.^[38]

2.1.1 Proteinogene Aminosäuren für Konjugationsreaktionen

Proteinkonjugate können durch Reaktionen erzeugt werden, welche selektiv die Seitenketten von proteinogenen Aminosäuren funktionalisieren. Cystein und Lysin werden am häufigsten adressiert (vgl. Abbildung 2-1).^[39] Die Thiolgruppe des Cystein-Restes wird mit Maleimiden durch eine Michael-Addition funktionalisiert. Das elektrophile Maleimid weist eine hohe Selektivität für Thiole auf und die Reaktion kann bei neutralem pH-Wert in Wasser durchgeführt werden. Die Thiol-Michael-Addition

zählt zu den „Klick-Reaktionen“^[40] und wird beispielsweise für die Produktion des ADCs Brentuximab Vedotin (*Adcetris*)^[41] eingesetzt. Diese Konjugationstechnik hat jedoch zwei Nachteile. Zum einen kann es durch die retro-Michael-Reaktion zur Dissoziation von Protein und synthetischer Gruppe kommen,^[42] zum anderen sind in vielen Proteinen mehrere Cystein-Reste vorhanden, was zu einer hohen Heterogenität der Produkte führt.^[43] Bei der Produktion von ADCs kann der Einbau von weiteren Cystein-Resten die Homogenität des Produktes verbessern. Die nativen Cystein-Reste im Antikörper sind oxidiert und bilden Disulfidbrücken aus. Deswegen findet die Thiol-Michael-Addition bevorzugt an den künstlichen Cystein-Resten statt. Durch die Mutation Ala114Cys in der schweren Kette von Trastuzumab (*Herceptin*) konnte ein Maytansinoid (Emtansin, DM1) Konjugat mit einem Toxin/Antikörper-Verhältnis (*drug to antibody ratio* - DAR) von zwei erzeugt werden. Die durch diese Technik erzeugten ADCs werden als *Thiomab* bezeichnet.^{[32][44]}

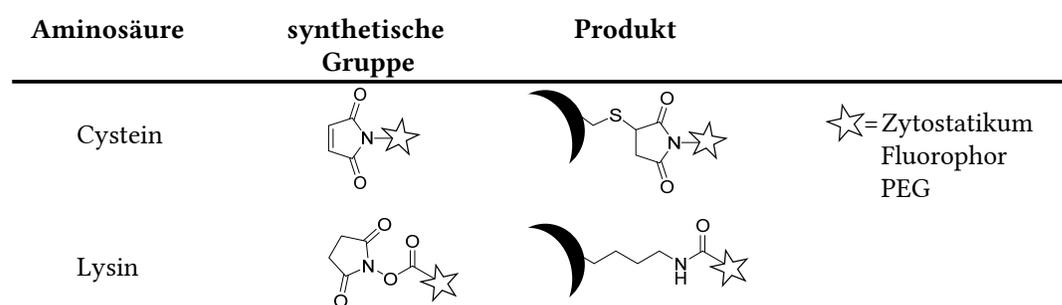


Abbildung 2-1 Thiol-Michael Addition und NHS-Aktivester für die Konjugation mit Cystein (Cys, C) und Lysin (Lys, K).

Aufgrund der vielfältigen Methoden zur Funktionalisierung primärer Amine, ist Lysin ein attraktives Ziel für Biokonjugationen. Die Seitenkette von Lysin reagiert mit Aktivestern, Sulfonyl-Chloriden, Isocyanaten und Isothiocyanaten zu Amiden, Sulfonamiden, Harnstoffen oder Thioharnstoffen. Am häufigsten werden N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Aktivester für die Konjugation mit Lysin eingesetzt. Das ADC Trastuzumab-Emtansin (*Kadcyla*)^[45] wird mit dieser Konjugationsstrategie produziert. Wie bei der Konjugation mit Cystein-Resten kommt es bei der Bildung von Amiden mit Lysin auch zu einer hohen Heterogenität aufgrund der statistischen Häufigkeit von Lysin unter den proteinogenen Aminosäuren. Nach der Konjugation von Trastuzumab (*Herceptin*) mit DM1 trägt der Antikörper ein bis acht, im Mittel 3.5 Wirkstoffmoleküle.^[46] In Abbildung 2-1 ist die Bildung eines Amids ausgehend vom NHS-Aktivester und Lysin gezeigt.

2.1.2 Unnatürliche Aminosäuren für Konjugationsreaktionen

Durch den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren können funktionelle Gruppen in ein Protein eingeführt werden, die normalerweise nicht in biologischen Systemen vorkommen. Für diese Technik wird ein orthogonales Paar von tRNA-Synthetase und tRNA benötigt, welches die Aminosäure an der Position eines Amber-Stopcodons (UAG) einbauen kann. Schultz *et al.* konnten mit Hilfe einer mutierten Aminoacyl-

tRNA-Synthetase aus *E. coli* und einer Amber-Suppressor tRNA aus *Bacillus stearothermophilus* sechs verschiedene unnatürliche Aminosäuren in Proteine einbauen, die in CHO-Zellen exprimiert wurden.^[47] Ein Vorteil dieser Technik liegt darin, dass die Position der nicht-proteinogenen Aminosäure variiert werden kann. Weiterhin ist der Einbau von verschiedenen Aminosäurederivaten möglich, was eine hohe chemische Flexibilität garantiert und zudem die Derivatisierung mit verschiedenen synthetischen Molekülen ermöglicht.^{[48][49]} Durch den Einbau von *trans*-Cycloocten können [4+2] Diels-Alder Cycloadditionen in lebenden Zellen durchgeführt werden. Nach der Reaktion mit einem Tetrazin-Fluorophor eignet sich dieses System besonders für die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen und dem *live cell imaging*.^{[50][51]} Abbildung 2-2 zeigt ein Beispiel für die Tetrazin-*trans*-Cycloocten-Ligation mit einem Cycloocten-Derivat von Lysin. Durch den Einbau von *p*-Acetylphenylalanin und der Oxim-Ligation können Trastuzumab (*Herceptin*) und Aminoxy-Auristatin F erfolgreich konjugiert werden. Für die Produktion von ADCs liefert die Methode jedoch zu geringe Ausbeuten während der Expression der Antikörper.^[52]

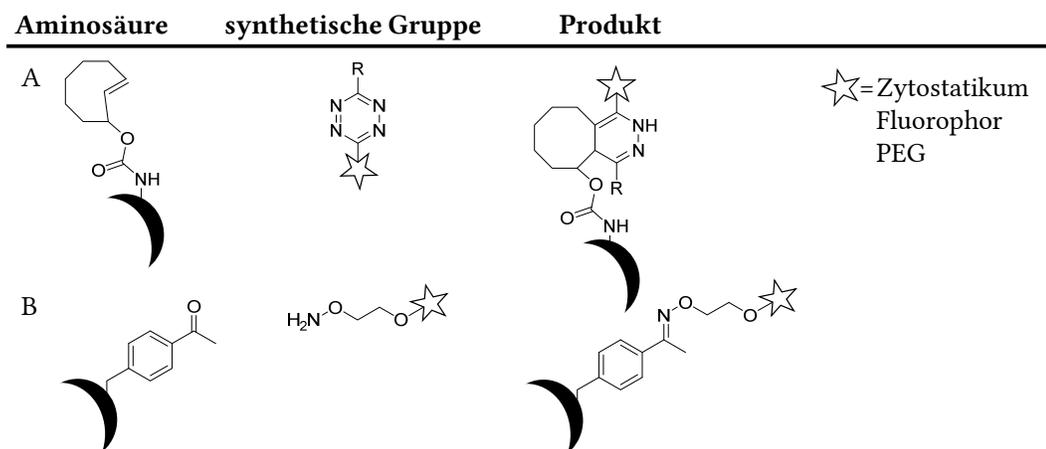


Abbildung 2-2 Konjugationsreaktionen mit nicht-proteinogenen Aminosäuren: (A) [4+2] Diels-Alder Cycloaddition mit einem *trans*-Cycloocten-Derivat von Lysin und einem Tetrazin. (B) Oxim-Ligation mit *p*-Acetylphenylalanin und einem Aminoxy-Motiv.^{[52][50]}

2.1.3 Enzymatische Modifizierungen für Konjugationsreaktionen

Für die enzymatische Modifizierung von Proteinen sind verschiedene Strategien möglich. In dem enzymatischen Ansatz erkennt das eingesetzte Enzym eine Peptidsequenz im Protein und verknüpft im Folgenden das synthetische Molekül mit der spezifischen Peptidsequenz. Die Transpeptidase Sortase A (SrtA) erkennt die Peptidsequenz LPXTG und erzeugt eine Peptidbindung mit einem oligo-Glycin-Nukleophil. Dieses Nukleophil kann verschiedene synthetische Moleküle wie Fluorophore beinhalten.^[53] Ähnliche Konjugationen können unter Verwendung von

Glykosyltransferasen,^[54] Phosphocholin-Transferasen (AnkX)^[55] und Transglutaminasen durchgeführt werden. Transglutaminasen katalysieren den Acyl-Transfer zwischen der ϵ -Aminogruppe von Lysin und dem γ -Carboxamid von Glutamin. Die native Erkennungssequenz aus dem Substratprotein DAIP für die Transglutaminase MTG aus *Streptomyces mobaraensis* lautet GTYFQAYGT.^[56] Hydrophobe Aminosäuren in der Nähe des Substrats^[57] und die Positionierung in einer flexiblen *loop*-Struktur erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit von MTG.^[58] Anstelle von Lysin können auch primäre Amine wie N-(5-Aminopentyl)Biotinamid eingesetzt werden.^[59] Cetuximab (*Erbix*) wurde durch den MTG-*tag* erfolgreich mit N-(5-Aminopentyl)Biotinamid konjugiert.^[56]

Ein Beispiel für den chemoenzymatischen Ansatz ist das C $^{\alpha}$ -Formylglycin-generierende Enzym (FGE). Es katalysiert die Oxidation von Cystein zu C $^{\alpha}$ -Formylglycin (FGly).^[1] Der elektrophile Aldehyd ermöglicht nach der Biotransformation die Konjugation mit synthetischen Molekülen durch die Oxim-Ligation oder die Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler Ligation.^[12] (Abschnitt 2.5) Der Aldehyd-*tag* wurde erfolgreich angewendet für die Erzeugung von Fusionsproteinen,^[11] ADCs^[27] oder für die Konjugation mit Glykanen.^[8] Abbildung 2-3 zeigt Beispiele für die enzymatische Modifizierung von Erkennungssequenzen durch Sortase A, Transglutaminase und FGE.

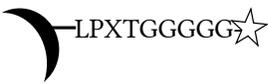
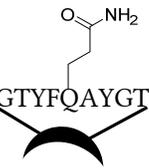
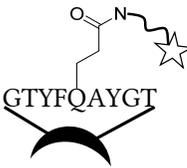
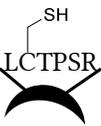
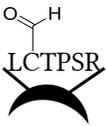
Peptidsequenz	Enzym	Edukt	Produkt
A 	Sortase A	H ₂ N-GGGGG☆	
B 	Transglutaminase	H ₂ N-☆	
C 	FGE	-	

Abbildung 2-3 Enzymatische Modifizierungen für die Proteinkonjugation: (A) Reaktion der C-terminalen LPXTG Erkennungssequenz für die Sortase A und einem oligo-Glycin-Nukleophil. (B) Transglutaminase-Reaktion mit Glutamin. (C) Oxidation von Cystein zu C $^{\alpha}$ -Formylglycin mit FGE.

2.2 C^α-Formylglycin

C^α-Formylglycin (FGly) ist eine nicht-kanonische Aminosäure und unterscheidet sich durch die Reaktivität als Elektrophil von allen übrigen 21 proteinogenen Aminosäuren. FGly ist für die Aktivierung der Typ-I-Sulfatasen essentiell.^[60] Diese Enzymklasse wird für die Hydrolyse von Sulfaten und Sulfamaten benötigt.^[61] Der Aldehyd (FGly) im aktiven Zentrum der Sulfatase wird nach dem Transesterifizierungsmechanismus (TE-Mechanismus) zum Diol hydratisiert. Das Diol greift den Sulfatester des Substrates nukleophil an und es entsteht ein Halbacetal. Abschließend wird die Sulfatgruppe durch die zweite Hydroxygruppe des Diols eliminiert, wodurch FGly in der Aldehydform regeneriert wird.^{[61][62]} Abbildung 2-4 zeigt den TE-Mechanismus mit der 1,1-Diol- und Aldehydform von FGE.

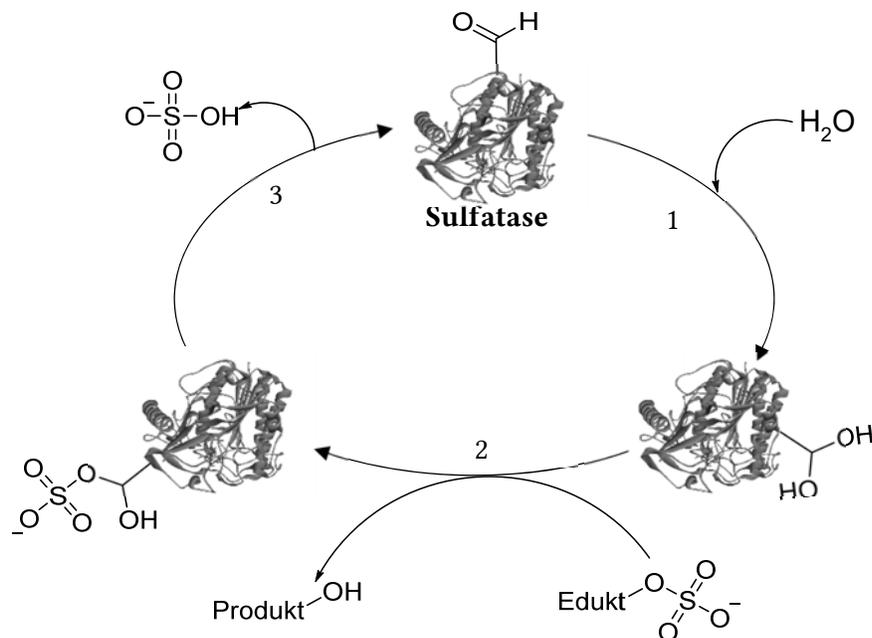


Abbildung 2-4 TE-Mechanismus der Sulfatesterspaltung: Unter physiologischen Bedingungen liegt FGly als Aldehydhydrat vor (1). Sulfatester und Sulfamate werden durch einen nukleophilen Angriff einer Hydroxylgruppe des FGly-Aldehydhydrats gespalten. Dabei entsteht vor der Sulfateliminierung ein kurzlebiges FGly-Sulfat-Addukt.^{[26][61]}

FGly wird posttranslational durch die Oxidation eines Serin- oder Cysteinrestes generiert. Es sind zwei verschiedene enzymatische Systeme zur FGly-Generierung bekannt, ein drittes wird postuliert.^{[60][63][64]} Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE) kommt in Pro- und Eukaryoten vor und katalysiert die Sauerstoff-abhängige Oxidation eines Cysteinrestes in dem Erkennungsmotiv (C-x/T-P-x/S-R).^{[65][66]} (Abschnitt 2.3) Das zweite System AtsB ist nur in Prokaryoten vorhanden und ist in der Lage, Serin oder Cystein unter anaeroben Bedingungen zu FGly umzusetzen.^[67] Das Erkennungsmotiv lautet (C/S-x-P/A-x-R).^[68] (Abschnitt 2.4)

Die Aldehydform von FGly ist für die bioorganische Chemie besonders interessant. Der Aldehyd in der Seitenkette der Aminosäure unterscheidet es sich in der Reaktivität von allen übrigen Aminosäuren. Durch das Einfügen des Erkennungsmotivs in Proteine und Peptide wird eine bioorthogonale Derivatisierung möglich.^{[3][5]}

2.3 Das Formylglycin-generierende Enzym

Die posttranslationale Oxidation von Cystein zu FGly in Eukaryoten wird durch das Formylglycin-generierende Enzym katalysiert.^[1] Das für das humane FGE kodierende Gen *SUMF1* befindet sich auf Chromosom 3p26 und ist 105 kb lang. *SUMF1* ist in Eukaryoten hochkonserviert^[69] und kommt ebenfalls in einigen Prokaryoten wie *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor*^[70] und *Thermomonospora curvata* vor.^[22] In *E. coli* und *C. elegans* konnte das FGly-generierende System bisher nicht aufgeklärt werden.^[69]

Das natürliche Substrat von FGE sind die Typ-I-Sulfatasen. Eine Fehlfunktion von FGE durch Mutationen im *SUMF1*-Gen resultiert in der Multiplen Sulfatasedefizienz (MSD).^[60] Die MSD ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit, die durch eine drastisch reduzierte katalytische Aktivität aller Sulfatasen gekennzeichnet ist. Aufgrund der geringeren FGE Aktivität fehlt FGly im aktiven Zentrum der Sulfatasen. Diese Krankheit kann bereits im Kindesalter letal sein.^{[1][71]} FGE ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und aktiviert hier die Sulfatasen ko-translational.^[65] Die Translokation von FGE in das ER wird durch ein N-terminales Signalpeptid (AS 1-33) gesteuert.^[1]

2.3.1 Struktur des humanen Formylglycin-generierenden Enzyms

Das humane FGE besteht aus 374 Aminosäuren. Nach der Abspaltung des N-terminalen ER-Signalpeptids enthält das 40 kDa Protein (AS 34-374, fFGE) acht Cystein-Reste und eine Glykosylierung an Asn¹⁴¹. Sechs dieser Cysteine liegen in der Kern-Domäne (AS 73-374, ΔFGE), zwei Cystein-Reste sind im N-Terminus (AS 34-72) lokalisiert. Bei der Sekretion von fFGE wird ein hoher Anteil trunkiert. Der N-Terminus wird hierbei an der Sequenz ⁶⁹RYSR⁷² durch Furin, PACE4 und PC5a abgespalten.^[72] Aufgrund der Prozessierung von fFGE und der hohen Flexibilität des N-Terminus, konnte bisher nur die Kristallstruktur von ΔFGE gelöst werden.^[73] (E. Ennemann, persönliche Kommunikation) Die globuläre Kern-Domäne zeigt einen niedrigen Anteil an definierten Sekundärstrukturelementen. 20 % des Proteins liegen als β-Faltblatt und 13 % als α-Helix vor. Weiterhin belegt die Kristallstrukturanalyse, dass die Cystein-Reste Cys²¹⁸ und Cys³⁶⁵ sowie Cys²³⁵ und Cys³⁴⁶ Disulfidbrücken ausbilden. Die Cysteine Cys³³⁶ und Cys³⁴¹ befinden sich auf der Oberfläche der Struktur innerhalb einer zugänglichen, länglichen Vertiefung. Sie wurden im Kristall sowohl in reduzierter als auch oxidiertes Form detektiert und sind ein Teil des katalytischen Zentrums von FGE.^[74]

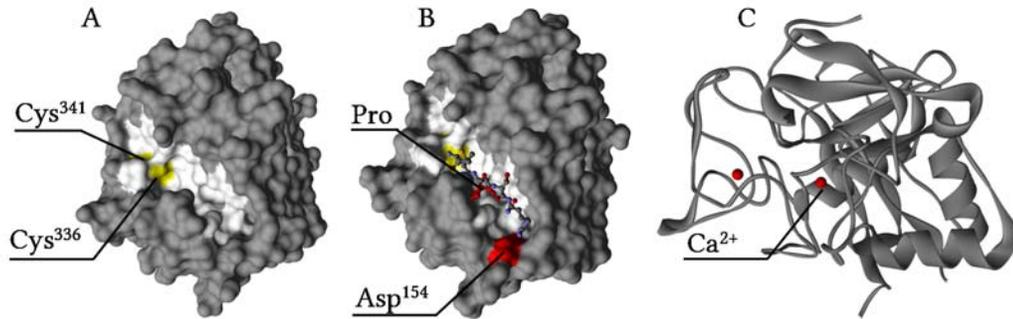


Abbildung 2-5 Kristallstrukturen von Δ FGE: (A) zeigt die Oberfläche mit dem aktiven Zentrum in Weiß. Die redox-aktiven Cystein-Reste Cys³⁴¹ und Cys³³⁶ sind gelb hervorgehoben. (PDB: 1Y1I) (B) enthält die Peptidsequenz LCTPSR im aktiven Zentrum. Das Prolin des Substratpeptids und Asp¹⁵⁴ sind rot markiert. Das Prolin interagiert mit der hydrophoben Bindungstasche von Δ FGE und Asp¹⁵⁴ bildet eine Salzbrücke zu dem Arginin-Rest im Peptid aus. (PDB: 2AIK) (C) zeigt in Rot die Ca²⁺-Ionen innerhalb der beiden Ca²⁺-Bindestellen. (PDB: 1Z70) [73]

Durch Kokristallisation von Δ FGE mit einem Substratpeptid, welches die Sequenz LCTPSR enthält, konnte die Substratspezifität erklärt werden. Der Arginin-Rest bildet mit einer Asparaginsäure im aktiven Zentrum eine Salzbrücke sowie Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Proteinrückgrat aus. Das Prolin innerhalb der Erkennungssequenz interagiert mit der hydrophoben Bindungstasche über van-der-Waals-Wechselwirkungen. Durch diese Interaktionen des Peptides/Proteins mit dem aktiven Zentrum von FGE gelangt das Substratcystein in räumliche Nähe zu dem redox-aktiven Cystein-Rest Cys³⁴¹. [73] Abbildung 2-5 zeigt Kristallstrukturen von Δ FGE aus verschiedenen Perspektiven. Das aktive Zentrum wird von Prolin¹⁸² und den redox-aktiven Cysteinen begrenzt. Teil C von Abbildung 2-5 zeigt zwei Ca²⁺-Kationen innerhalb der Kristallstruktur. In Bindestelle 1 wird Ca²⁺ durch die Aminosäuren Ile²⁶⁰, Phe²⁷⁵, Asn²⁵⁹ und Asp²⁷³ koordiniert. Für die Bindung des zweiten Ca²⁺-Kations sind die Aminosäuren Glu¹³⁰, Glu³⁰⁰, Asn²⁹³, Gly²⁹⁶ und Ala²⁹⁸ verantwortlich. Innerhalb der Kristallstrukturen konnten keine weiteren Metallionen oder Kofaktoren gefunden werden. [74][73]

2.3.2 Struktur des prokaryotischen Formylglycin-generierenden Enzyms

Neben humanem FGE existieren verschiedene prokaryotische Homologe, welche ebenfalls die posttranslationale Oxidation eines Cystein-Restes in Typ-I-Sulfatasen katalysieren. Die prokaryotischen Enzyme aus *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* [70] und *Thermomonospora curvata* [22] wurden genauer charakterisiert. Abbildung 2-6 zeigt einen phylogenetischen Baum verschiedener FGE Homologen und einen Ausschnitt des Sequenz-Vergleiches. [75]

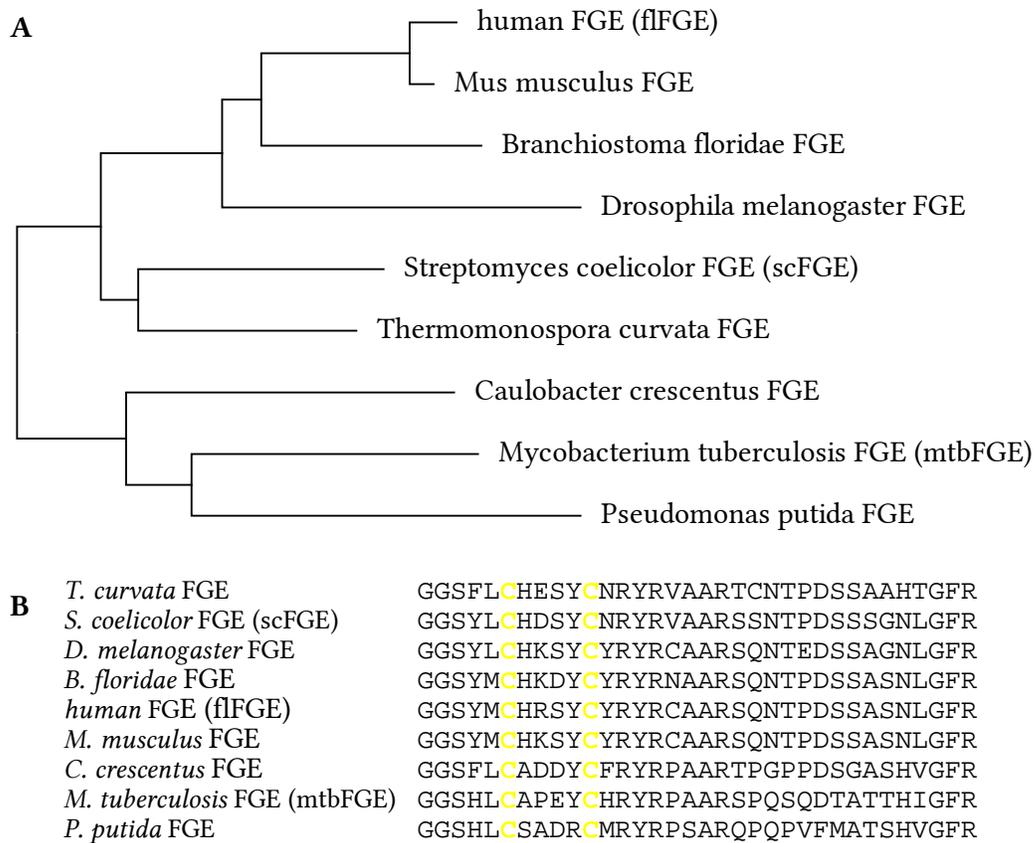


Abbildung 2-6 Sequenzvergleich verschiedener FGE Homologen: (A) Phylogenetischer Baum von verschiedenen FGE Homologen, erstellt nach dem *maximum parsimony* Algorithmus. Die eukaryotischen Enzyme bilden eine Klade. Der Vergleich zwischen fIFGE und scFGE zeigt eine Identität von 51.5% in Bezug auf die Aminosäuresequenz der beiden Enzyme.^[76] (B) Ausschnitt des *multiple alignments* (AS 331-364) mit den redox-aktiven Cystein-Resten C5 und C6 welche in allen Homologen konserviert sind.

Es wird deutlich, dass in der Aminosäuresequenz eine hohe Ähnlichkeit vorliegt. Weiterhin ist die Kristallstruktur von scFGE gelöst. Ein Vergleich der Tertiärstrukturen von scFGE und Δ FGE zeigt ebenfalls eine hohe Übereinstimmung. Der Gesamtanteil an α -Helix und β -Faltblatt-Motiven in scFGE beträgt etwa 30 % und ist damit ähnlich gering wie beim humanen Δ FGE. Auch in dieser Struktur wurden Hinweise auf eine partielle Disulfidbrücke zwischen den redox-aktiven Cysteinen, Cys²⁷² und Cys²⁷⁷ in scFGE gefunden. Abbildung 2-7 verdeutlicht die Ähnlichkeit innerhalb der Enzymfamilie. Die Kristallstruktur von scFGE ist je nach Sequenzkonservierung in der FGE-Familie gefärbt. In räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum ist die höchste Konservierung zu finden.^[77] Die berechnete 3D-Struktur von mtbFGE zeigt eine hohe Homologie zu humanem Δ FGE und scFGE.

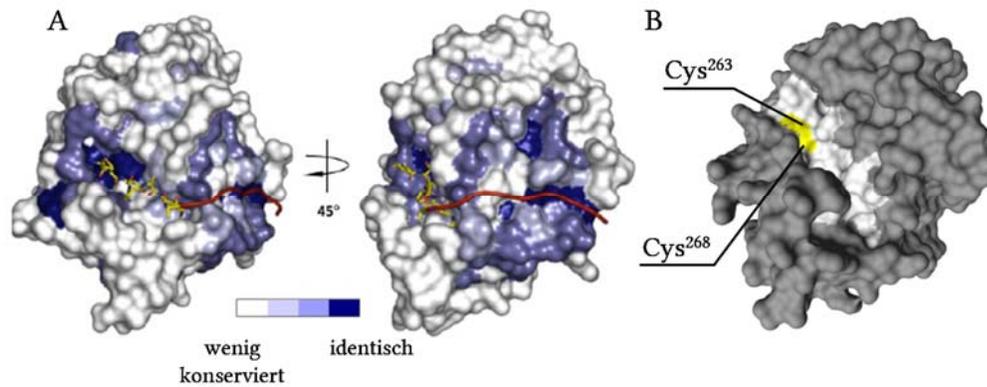


Abbildung 2-7 Strukturen von prokaryotischen FGE Homologen: (A) Kristallstruktur von scFGE. Die Färbung erfolgt von Weiß (gering) nach Blau (hoch) je nach Sequenzkonservierung in der FGE-Familie. Weiterhin ist ein Substratpeptid in die Struktur hineinmodelliert.^[77] (B) Mit Hilfe der Software I-Tasser^[78] berechnete Struktur von mtbFGE. Auch dieses prokaryotische Enzym zeigt eine große Ähnlichkeit zu humanem FGE. Die redox-aktiven Cystein-Reste Cys²⁶³ und Cys²⁶⁸ sind in Gelb dargestellt. Das aktive Zentrum wird in Weiß hervorgehoben.^[79]

Im Vergleich der FGly-generierenden Enzyme scFGE, mtbFGE und humanem fFGE finden sich trotz hoher Homologie in der Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur drei signifikante Unterschiede. Nur humanes fFGE verfügt über die N-terminale Domäne (AS 34-72), welche bei der Sekretion durch Furin, PACE4 und PC5a abgespalten wird.^[72] Der zweite Unterschied offenbart sich durch den Gehalt an im Enzym gebundenen Ca²⁺-Kationen. Humanes FGE verfügt über zwei Ca²⁺-Bindestellen und das prokaryotische scFGE besitzt eine Ca²⁺-Bindestelle. Im Gegensatz dazu enthält FGE aus *M. tuberculosis* keine Ca²⁺-Bindestelle.^{[74][77]} Der dritte Unterschied liegt in den Cystein-Resten. Nur im humanen FGE sind die strukturellen Disulfidbrücken zwischen Cys²¹⁸ (3) und Cys³⁶⁵ (C8) sowie Cys²³⁵ (4) und Cys³⁴⁶ (C7) zu finden. Dies ist dadurch zu erklären, dass humanes FGE die Oxidation von Cystein zu FGly im ER durchführt. In diesem Kompartiment der Zelle liegen oxidierende Bedingungen vor. In Prokaryoten ist FGE im Cytosol ansässig, wo vorwiegend reduzierende Bedingungen anzutreffen sind.^[17] In allen drei Enzymen sind die redox-aktiven Cystein-Reste sowie C8 konserviert, jedoch nicht die übrigen Cysteine. So enthält die Sequenz von mtbFGE an der Position von C7 im humanen FGE einen Prolin-Rest.

2.3.3 Katalytische Aktivität des Formylglycin-generierenden Enzyms

Die Oxidation von Cystein durch FGE findet *in vivo* ko-translational noch vor der Faltung des Substrates statt.^{[80][81]} Der Katalysemechanismus von FGE ist bisher nicht vollkommen aufgeklärt. Es wurde ein Monooxygenase-Mechanismus postuliert. Diese Annahme basiert auf den Kristallstrukturen von ΔFGE und scFGE, welche Erkenntnisse über die Redox-Zustände der beiden Cysteine im aktiven Zentrum von FGE liefern.^{[73][77]} Weiterhin wurde beobachtet, dass während der Reaktion äquimolare Mengen an molekularem Sauerstoff verbraucht werden.^[82] Zusätzlich wird ein

Reduktionsmittel für die Konversion von Cystein zu FGly benötigt. Ein Oxidase-Mechanismus gilt als unwahrscheinlich, da keine Bildung von Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden konnte. Der initiale Schritt des von Peng *et al.* postulierten Katalysemechanismus ist die Bildung eines Sulfensäure-Derivates von Cys³³⁶ durch molekularen Sauerstoff.^[82]

Diese Hypothese wird durch eine abweichende Elektronendichte am Cys³³⁶ in der Struktur von FGE untermauert, welche unter bestimmten Kristallisationsbedingungen gefunden wurde. Diese Abweichung in der Elektronendichte ist durch das Sulfensäure-Derivat zu erklären.^[60] Das zweite Sauerstoffatom oxidiert das Substratcystein unter Ausbildung einer weiteren Sulfensäure. Durch Abspaltung von Wasser bildet sich die Disulfidbrücke zwischen Cys³³⁶ und Cys³⁴¹ im aktiven Zentrum von FGE. Um die Cystein-Reste im Enzym für einen weiteren Zyklus zu regenerieren, wird ein Reduktionsmittel wie z.B. DTT oder GSH benötigt. Die Sulfensäure im Substrat zerfällt unter Abspaltung von Wasser zu einem Thioaldehyd, welcher abschließend unter Freisetzung von Schwefelwasserstoff den Aldehyd FGly generiert.^[82]

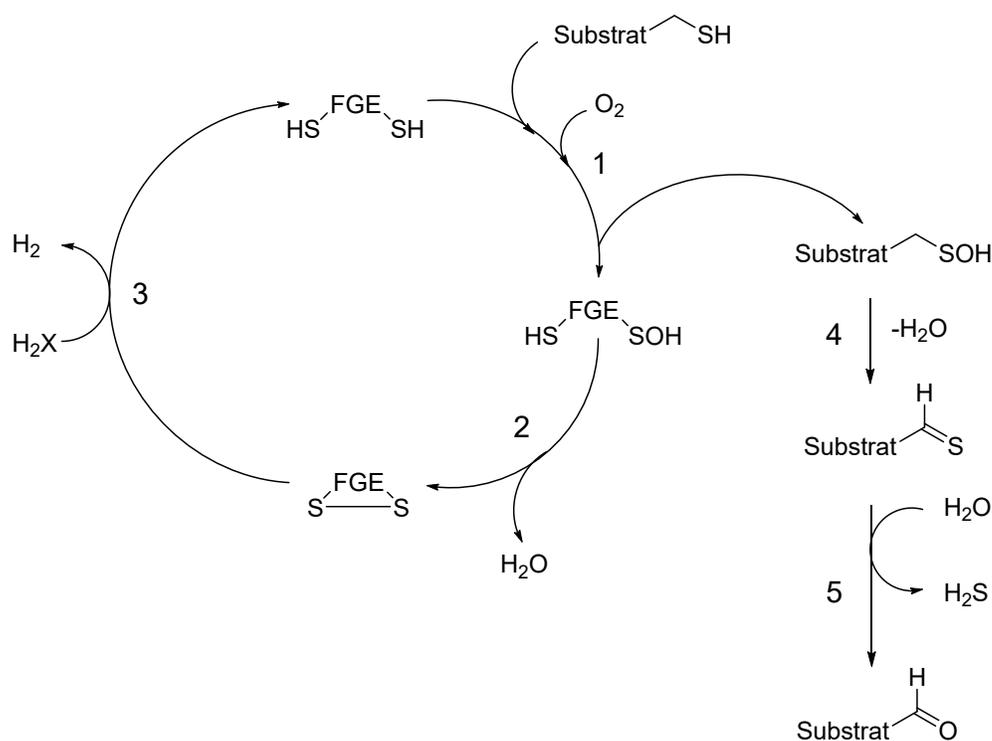


Abbildung 2-8 Postulierter Katalysemechanismus nach Peng *et al.*: (1) Im initialen Schritt wird durch molekularen Sauerstoff eine Sulfensäure am Cys³³⁶ und eine weitere Sulfensäure im Substrat gebildet. (2) Nach der Hydrolyse der Sulfensäure³³⁶ bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen den beiden redox-aktiven Cystein-Resten aus. (3) Im finalen Schritt des Katalysezyklus werden die Cysteine Cys³³⁶ und Cys³⁴¹ durch ein Reduktionsmittel wie z.B. GSH reduziert. (4) Die Sulfensäure im Substrat lagert sich unter Wasserabspaltung zu einem Thioaldehyd um (5) und wird im letzten Schritt unter Bildung von H₂S zum FGly umgesetzt.^[82]

Bisher war jedoch die Detektion von Schwefelwasserstoff während der Konversion von FGly nicht möglich. Gängige H₂S-Sonden^{[83][84]} waren in Gegenwart von relativ hohen Konzentrationen an Thiolen nicht zuverlässig, um die Freisetzung von Schwefelwasserstoff zu beweisen.^{[17][85]} Abbildung 2-8 zeigt eine Übersicht des hypothetischen Mechanismus.

FGE zeigt *in vitro* eine geringe spezifische Aktivität für Substratpeptide und Proteine. Mögliche Ursachen könnten das Fehlen von Kofaktoren, fehlenden Hilfsenzymen oder posttranslationalen Modifizierungen sein.^[22] Jedoch wurden in früheren Studien außer Calcium keine zusätzlichen Metallionen oder andere Kofaktoren in FGE identifiziert.^{[74][60]} Neue Studien von Knop *et al.* und Holder *et al.* berichten eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivität *in vitro* und *in vivo* in Anwesenheit von Kupfer-Ionen.^{[22][17][20]}

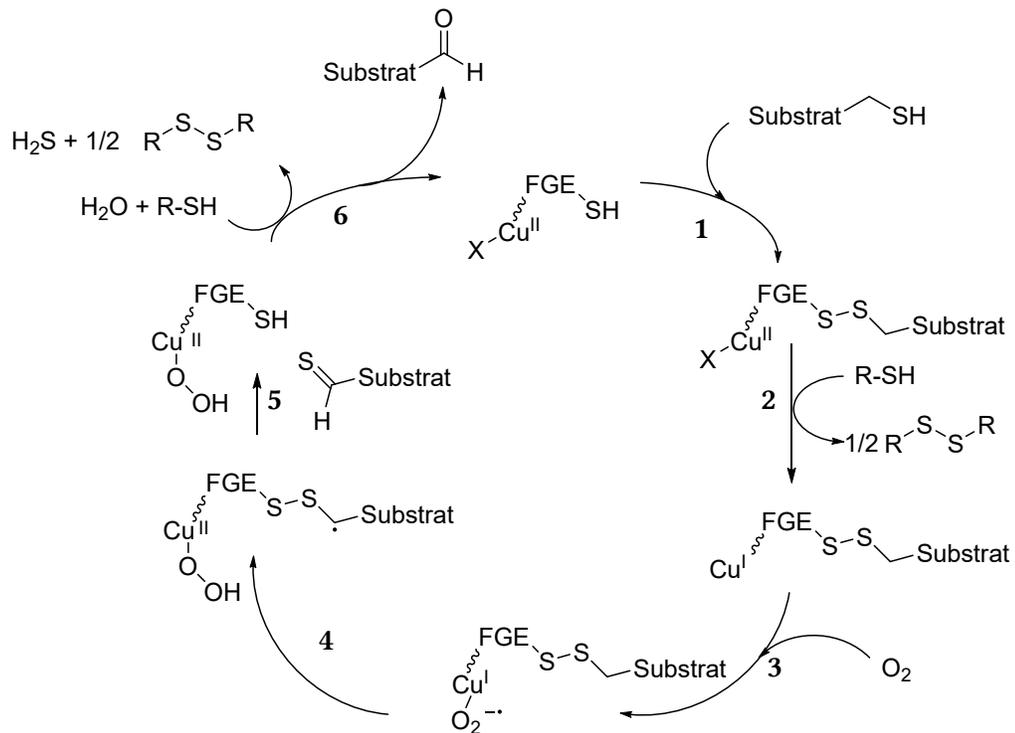


Abbildung 2-9 Postulierter Mechanismus nach Rabuka *et al.*: (1) Im initialen Schritt wird ein gemischtes Disulfid zwischen dem Substratcystein und Cys³⁴¹ gebildet. (2) Ein Reduktionsmittel wie GSH wird für die Reduktion von Cu^{II} zu Cu^I benötigt. (3) In Folge dessen bindet Cu^I Sauerstoff und das Superoxo-Intermediat (4) kann ein Disulfid-Radikal ausbilden. (5) Das Disulfid-Radikal bildet dann einen Thioaldehyd und (6) Cys³⁴¹ wird durch eine zweite ein Proton-, ein Elektron-Reduktion zurückgebildet, während der Thioaldehyd zum Aldehyd hydrolysiert wird.^[17]

Nach Rekonstitution von scFGE und ΔFGE mit Kupfersulfat und folgender Entfernung von überschüssigen Kupfer-Kationen konnte eine Steigerung der spezifischen Aktivität von scFGE von 214 pkat·mg⁻¹ auf 3579 pkat·mg⁻¹ gemessen werden. Auch die Aktivität von ΔFGE steigt um den Faktor drei an.^[17] Die Reinigung nach der Rekonstitution mit

Kupfer-Ionen ist notwendig, da Cu^{II} in Anwesenheit von Sauerstoff die Bildung von Disulfidbrücken katalysiert und somit Reduktionsmittel wie DTT und GSH in Lösung oxidiert und die Bildung von Substratdimeren begünstigt.^[86] ICP-MS Messungen deuten darauf hin, dass scFGE und ΔFGE nach Reinigung mittels IMAC als Apoenzym vorliegen und nach Rekonstitution mit Kupfer-Ionen stöchiometrische Mengen Kupfer-Ionen enthalten. Ein von Rabuka *et al.* postulierter Mechanismus geht davon aus, dass im ersten Schritt des Katalysezyklus ein Disulfid zwischen Cys³⁴¹ und dem Substratcystein gebildet wird.^[17]

Es wird vermutet, dass es sich bei FGE um eine Kupfer-Oxidase handelt, die in einer 2H⁺/2e⁻ Oxidation molekularen Sauerstoff aktiviert. Reduktionsmittel wie DTT, GSH oder β-Mercaptoethanol werden für die Reduktion von Cu^{II} zu Cu^I benötigt. In Folge dessen bindet Cu^I Sauerstoff und das Superoxo-Intermediat kann ein Disulfid-Radikal ausbilden. Das Disulfid-Radikal bildet einen Thioaldehyd und Cys³⁴¹ wird durch eine 1H⁺/1e⁻ Oxidation-Reduktion zurückgebildet, während der Thioaldehyd zum Aldehyd hydrolysiert wird.^[17] Knop *et al.* berichten ebenfalls von einer Aktivitätssteigerung von FGE aus *Thermomonospora curvata* und *Mycobacterium smegmatis* in Gegenwart von Kupferkationen.^[22]

Bei humanem fFGE könnte auch die Konzentration an Calcium-Ionen eine Rolle für die katalytische Aktivität spielen. T. Beuel konnte zeigen, dass die spezifische Aktivität von fFGE mit der Calcium-Konzentration zunimmt und bei einer Konzentration von 2 mM ein Maximum erreicht.^[87]

Eine weitere Besonderheit von humanem fFGE ist die N-terminale Domäne, welche *in vivo* essentiell für die Aktivierung der Sulfatasen ist.^[88] Es konnte gezeigt werden, dass Alanin-Varianten von Cys⁵⁰ und Cys⁵² Sulfatasen *in vivo* deutlich schlechter aktivieren.^[88] *In vitro* ist fFGE in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie DTT oder β-Mercaptoethanol und GSH katalytisch aktiv. Im Gegensatz dazu zeigt ΔFGE mit dem Reduktionsmittel GSH keine katalytische Aktivität.^[85] Insgesamt wird für eine effiziente Oxidation von Cys zu FGly *in vitro* molekularer Sauerstoff,^[82] sowie ein Reduktionsmittel benötigt.^[5] Durch die Rekonstitution mit Kupfer kann eine höhere Spezifische Aktivität erreicht werden.^{[17][22]}

2.3.4 Konsensussequenz für die FGly-Konversion

FGE katalysiert die Sauerstoff-abhängige Oxidation eines Cysteinrestes in dem Erkennungsmotiv (C-x/T-P-x/S-R), das in den Typ I-Sulfatasen hochkonserviert ist.^[66] Die Arylsulfatase A (ASA), eines der nativen Substrate von hFGE, enthält die Peptidsequenz LCTPSRAALLTGR.^[89] Die Aminosäuren Pro⁷¹ und Arg⁷³ in der ASA-Sequenz sind für die Interaktion mit dem aktiven Zentrum von hFGE entscheidend.^[73] Die Aminosäuren TGR sind ebenfalls in der Familie der Typ-I Sulfatasen konserviert und erhöhen die Effektivität der FGly-Generierung.^[66] In der N-Acetyl-Glucosamine-6-sulfatase lautet die Hilfssequenz TGK.^{[90][91]} Abbildung 2-10 zeigt einen Alanin-Scan der FGE-Konsensussequenz.

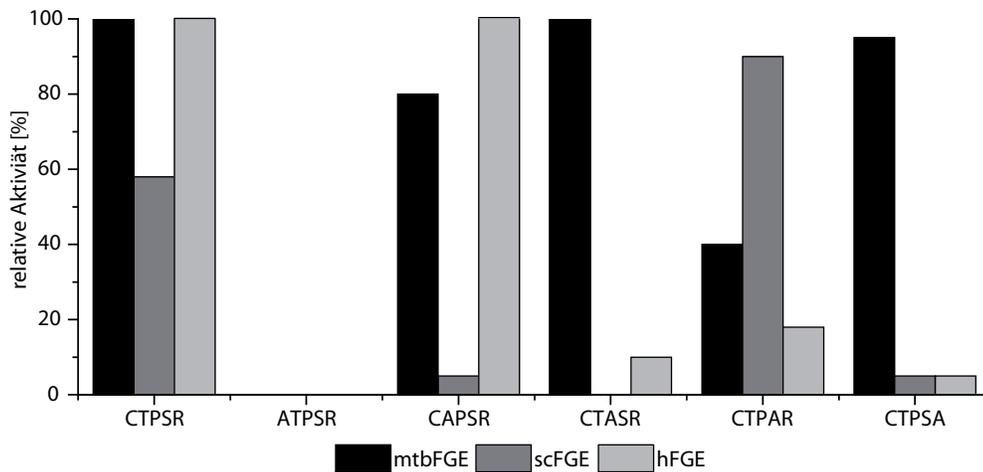


Abbildung 2-10 Alanin-Scan der FGE-Konsensussequenz: Die Daten für hFGE stammen von Dierks *et al.*. Hier wurden Peptid-Varianten mit der Aminosäure-Sequenz (AS 19-200) der ASA mit Mikrosomen inkubiert und der Anteil an FGly in der Peptidsequenz bestimmt.^[66] Die Daten für mtbFGE und scFGE stammen von Bertozzi *et al.* und wurden durch die *in vitro* Konversion von Peptiden mit FGE bestimmt. Die Mutation des Substrat-Cysteins (ATPSR) dient als Negativ-Kontrolle. Die Aktivitäten sind in Prozent relativ zur wt-Sequenz angegeben.^[70]

Im Vergleich der relativen Aktivitäten wird deutlich, dass mtbFGE im Verhältnis zu hFGE und scFGE die meisten Abweichungen von der Konsensussequenz toleriert.^{[66][70]} Der Vergleich zwischen mtbFGE und scFGE zeigt, dass trotz der hohen Sequenzhomologie von 46% eine unterschiedliche Sequenzspezifität der Enzyme vorliegt. Dies kann durch eine unterschiedliche Struktur der aktiven Zentren erklärt werden. Das aktive Zentrum von mtbFGE bietet mehr Platz und toleriert daher Sequenzabweichungen im Substrat besser als scFGE.

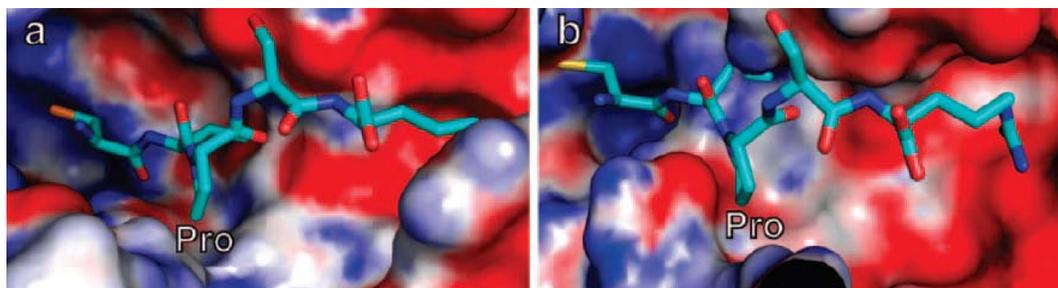


Abbildung 2-11: Vergleich der aktiven Zentren von scFGE (a) und mtbFGE (b). Das elektrostatische Potential wird in Blau (negativ) und in Rot (positiv) dargestellt. Zusätzlich wurde die Sequenz CTPSR hineinmodelliert. (a) Die Kristallstruktur von scFGE zeigt, dass das aktive Zentrum deutlich enger ist, als die Furche von (b) mtbFGE.^[70]

Abbildung 2-11 zeigt die Kristallstruktur des aktiven Zentrums von scFGE und ein Modell von mtbFGE. Es wird deutlich, dass die Furche welche für die Bindung der Substratsequenz verantwortlich ist bei mtbFGE deutlich breiter ist.^[70]

2.4 Das Radikal-SAM-Protein AtsB

In Prokaryoten existiert neben dem Sauerstoff-abhängigen FGE ein weiteres System für die posttranslationale Oxidation von Serin und Cystein zu FGly. Die Arylsulfatase A (AtsA) aus *Klebsiella pneumoniae* ist eine Serin-Sulfatase, welche durch AtsB aktiviert wird. Beide Enzyme sind in einem Operon zu finden.^{[65][92]} Das Erkennungsmotiv für AtsB lautet (C/S-x-P/A-x-R).^[68] Das *Klebsiella pneumoniae* AtsB ist 395 Aminosäuren lang und enthält das C-x₃-C-x-Y-C-Y Motiv, welches für die Radikal-SAM-Familie charakteristisch ist. Diese Enzymfamilie enthält Eisen-Schwefel-Cluster in denen S-Adenosylmethionin (SAM) an ein Eisenatom koordiniert.^[93] Mößbauer- und EPR-Studien konnten zeigen, dass AtsB drei [4Fe-4S]⁺ Cluster enthält.^{[94][95]} Weitere AtsB-Enzyme konnten in *Methanosarcina mazei* (MM-AtsB)^[96] und *Clostridium perfringens* gefunden werden.^{[97][98]}

Der von Fang *et al.* postulierte Reaktionsmechanismus für die AtsB-Proteine geht davon aus, dass der [4Fe-4S]⁺-Cluster durch einen Elektronen-Transfer auf SAM oxidiert wird. Das hierbei erzeugte SAM-Radikal zerfällt durch einen homolytischen Bindungsbruch zu Methionin und einem Adenosylradikal. Im nächsten Schritt abstrahiert das Adenosylradikal ein Wasserstoffatom des Serin-Restes in der Substratsequenz. Durch einen weiteren Elektronen-Transfer wird das Serin-Radikal zu FGly oxidiert und der [4Fe-4S]²⁺-Cluster wird reduziert.^[63]

2.5 Methoden für die Bioorthogonale Konjugation mit C^α-Formylglycin

2.5.1 Die Oxim- und Hydrazon-Ligation

Die chemoenzymatische Modifizierung von Proteinen und Peptiden durch FGE umfasst zwei Schritte. Nach der erfolgreichen Oxidation von Cystein durch ΔFGE, mtbFGE oder anderer FGE-Homologen erfolgt die Ligation mit einer synthetischen Gruppe. Erste Anwendungen gehen von Hydroxylamin- oder Hydrazin-Bausteinen aus.^[99] Diese Reaktionen sind ohne großen synthetischen Aufwand durchzuführen und zeigen in wässriger Lösung eine gute Selektivität für Carbonylverbindungen. Beide Konjugationstechniken besitzen jedoch erhebliche Nachteile. Zum einen handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion und zum anderen ist ein saures Reaktionsmilieu nötig.^[100] Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, kann es durch die Rückreaktion zu einer Dissoziation von Protein/Peptid und synthetischer Gruppe kommen. Stabilitätstests eines ADCs, welcher durch die Oxim-Ligation konjugiert wurde zeigen, dass in humanem Plasma bei 37 °C, nach 18 h, 40 % des Konjugates dissoziiert vorliegt.^[12]

Weiterhin ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxim-Ligation gering. Bei der Konjugation eines αHER2-FGly Antikörpers mit einem Maytansin-Oxim lag die Ausbeute nach 2 h bei pH 4.5 bei nur 12 %.^[27] Die Verwendung von Anilin als Katalysator kann in manchen Fällen die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion und die Lage des Gleichgewichtes optimieren.^{[99][101]} Jedoch kann Anilin bei vielen biologischen

Anwendungen aufgrund der Toxizität nicht eingesetzt werden.^[102] Abbildung 2-12 zeigt die Oxim- und Hydrazon-Ligation. Durch die enzymatische Modifizierung mit mtbFGE und einer folgenden Oxim-Ligation konnten Rabuka *et al.* heterobifunktionale Proteine herstellen. Ein humaner IgG Antikörper wurde mit dem *maltose-binding protein* (MBP) oder dem *human growth hormon* (hGH) modifiziert. Der optimale pH-Wert für diese Reaktion liegt bei 4.5.^[11]

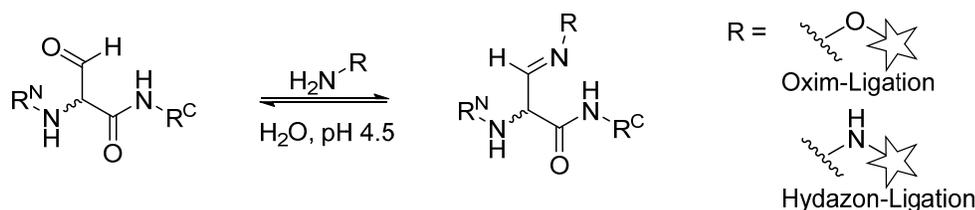


Abbildung 2-12 Oxim- und Hydrazon-Ligation: Durch diese Gleichgewichtsreaktion zwischen FGly und einem Hydroxylamin oder Hydrazin können bei pH-Wert 4.5 verschiedene Funktionalitäten (Stern) in ein Protein oder Peptid eingeführt werden.^[103]

2.5.2 Die Wittig-Reaktion

Die Wittig-Reaktion ermöglicht die Synthese von Alkenen, ausgehend von Aldehyden und Ketonen. Durch die Reaktion eines Phosphorylids mit der Carbonylgruppe wird der Carbonylsauerstoff substituiert und eine stabile Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung gebildet. Hierbei gilt, dass Aldehyde reaktiver sind als Ketone. Insgesamt wird ein vielfältiges Spektrum an funktionellen Gruppen toleriert. Beispielsweise sind Carbonsäureester gegenüber einer Wittig-Reaktion inert.^{[104][105]} Die *cis/trans*-Selektivität der Wittig-Reaktion hängt im wesentlichen von der Stabilität des verwendeten Ylides ab. Phosphor-Ylide können aufgrund ihrer Substituenten am α -Kohlenstoffatom kategorisiert werden (vgl. Tabelle 2-1) Ist der Substituent R ein Alkyl-Rest sind diese Ylide sehr reaktiv und nur unter Schutzgasatmosphäre stabil. Mit reaktiven Yliden führen Wittig-Reaktionen mit Aldehyden und Ketonen bevorzugt zu Z-Produkten.^[106]

Tabelle 2-1 Eigenschaften verschiedener Phosphor-Ylide:

Struktur	Klassifizierung	Stabilität	Selektivität
$\text{Ph}_2\text{P}(\text{Ph})=\text{CH}-\text{R}$ R = Alkyl	reaktive Ylide	rapide Hydrolyse	Z
$\text{Ph}_2\text{P}(\text{Ph})=\text{CH}-\text{R}$ R = Aryl, Alkenyl	semi-stabile Ylide	langsame Hydrolyse	E oder Z
$\text{Ph}_2\text{P}(\text{Ph})=\text{CH}-\text{R}$ R = Ester, Carbonyl	stabile Ylide	kaum Hydrolyse	E

Im Vergleich hierzu werden bei Reaktionen mit semi-stabilisierten Yliden meistens Isomerengemische erhalten. Wenn der Substituent R eine Carbonylgruppe ist, wird durch den π -Akzeptor-Substituenten eine zusätzliche Grenzstruktur ermöglicht, wodurch eine Stabilisierung des Ylids erreicht wird.^[106] Reaktionen mit stabilisierten Yliden zeigen eine gute E-Selektivität, jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit im

Vergleich zu den anderen Yliden gering und in seltenen Fällen ist die Zuführung von thermischer Energie notwendig.^[107] Die Deprotonierung des Phosphoniumsalzes ist bei stabilisierten Yliden durch Hydroxide oder Alkoholate in wässriger Lösung möglich.^[108] Nach der Deprotonierung des Phosphoniumsalzes wird durch die Reaktion zwischen Ylid und Carbonylgruppe ein Oxaphosphetan als Zwischenprodukt gebildet. Aufgrund der hohen Affinität zwischen Phosphor und Sauerstoff erfolgt die Desoxigenierung und durch Cycloreversion wird das Alken freigesetzt. (vgl. Abbildung 2-13).^[109]

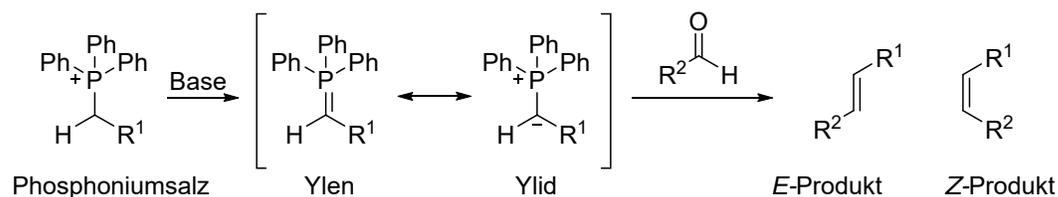


Abbildung 2-13 Mechanismus der Wittig-Reaktion: Durch die Deprotonierung des Phosphoniumsalzes wird das Ylid gebildet. Reaktive Ylide führen zu Z-Produkten, wohingegen stabilisierte Ylide eine E-Selektivität zeigen.^[109]

In Arbeiten von A. El-Batta *et al.* wurde beschrieben, dass Wittig-Reaktionen mit stabilisierten Yliden in wässriger Lösung, mit Ausbeuten bis zu 99 % und sehr guten Selektivitäten bis hin zu 98 % E-Produkt möglich sind.^[110] Während dieser Reaktionen war die Reaktionsgeschwindigkeit der Produktbildung höher, als die Hydrolyse der Ylide.^[110] Ähnliche Reaktionsbedingungen wurden von M. J. Han für die Derivatisierung von Proteinen eingesetzt. Nach der Oxidation von Serin durch NaIO₄ wurde der N-terminale Aldehyd durch stabilisierte Ylide funktionalisiert. Bei diesen Experimenten wurde *tert*-Butanol als Kosolvent eingesetzt, um die Löslichkeit der unpolaren Ylide zu verbessern.^[108] Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Wittig-Reaktion als bioorthogonale Reaktion für die Derivatisierung von FGly eingesetzt werden könnte. Im Gegensatz zu der klassischen Oxim-Ligation wird durch die Wittig-Reaktion ein hydrolysestabiles Alken gebildet.

2.5.3 Die Pictet-Spengler-Reaktion

Für eine bioorthogonale Modifizierung von Proteinen oder Peptiden sollte die erzeugte Bindung stabil sein, da eine hydrolyseempfindliche Bindung zwischen Protein und synthetischer Gruppe die Anwendung im biologischen System stark einschränkt.^[100] Eine Möglichkeit für die stabile Konjugation mit Aldehyden bietet die Pictet-Spengler-Reaktion, eine Abwandlung der Mannich-Reaktion. In der Pictet-Spengler-Reaktion wird ein Aldehyd mit β -Arylethylamin wie z. B. Tryptamin zum korrespondierenden Immoniumion umgesetzt, welches durch einen nukleophilen Angriff des Indolrings zum sekundären Amin weiterreagiert, wodurch eine stabile Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung ausgebildet wird.^[111] Abbildung 2-14 zeigt eine Pictet-Spengler-Reaktion mit Tryptamin. In der organischen Chemie wird die Pictet-Spengler-Reaktion für die Synthese von Alkaloiden eingesetzt.^[112]

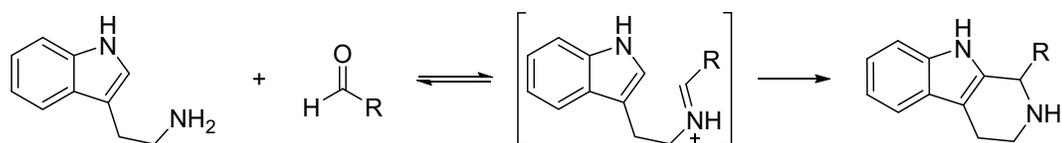


Abbildung 2-14 Pictet-Spengler-Reaktion mit Tryptamin: Das intermediäre Immoniumion bildet durch den nukleophilen Angriff des Indolringes eine stabile C-C Bindung aus. Das sekundäre Amin ist hydrolysestabil.^[111]

Von Agarwal *et al.* wurden Varianten dieser Reaktion für die Produktion von ADCs erprobt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Bildung des Immoniumions, weshalb für die Pictet-Spengler-Ligation ein Hydroxylamin-Derivat von Indol eingesetzt wird. α -Nucleophile zeigen eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit mit Carbonylelektrophilen im Vergleich zu den korrespondierenden Aminen.^[113] Um die Reaktionsgeschwindigkeit für die Bildung der C-C Bindung zu erhöhen, wurde der Aminoxy-Substituent an Position 2 im Indol platziert. Position 3 im Indol ist das stärkere Nucleophil und eignet sich besser für den nukleophilen Angriff auf das Oxyiminiumion. Diese Variante der Pictet-Spengler-Ligation wird als *iso*-Pictet-Spengler-Ligation bezeichnet.^[114] Zusätzlich wurde der Aminoxy-Substituent methyliert, um ein reaktiveres Oxyiminiumion zu erhalten.^[113] Abbildung 2-15 zeigt die *iso*-Pictet-Spengler-Ligation nach Agarwal *et al.*

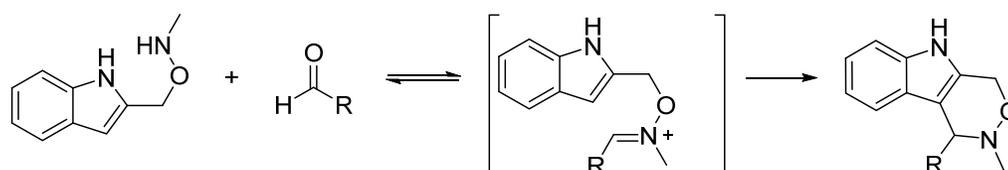


Abbildung 2-15 *iso*-Pictet-Spengler-Ligation: Im Vergleich zu der klassischen Pictet-Spengler-Reaktion ist die Reaktionsgeschwindigkeit der *iso*-Pictet-Spengler-Ligation bei Raumtemperatur und leicht sauren Bedingungen (pH 4.5) höher. Aufgrund des α -Nucleophils wird die Bildung des Oxyiminiumion beschleunigt. Weiterhin ist die Ausbildung der C-C Bindung in Position 3 des Indols begünstigt.^[113]

Eine weitere Verbesserung der Reaktionsgeschwindigkeit durch erhöhte Nucleophilie zeigt sich beim Einsatz einer Hydrazin-Struktureinheit, welche eine höhere Nucleophilie besitzt. Die Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler-Ligation (HIPS) kann bei einem nahezu physiologischen pH-Wert (pH 6) für die Konjugation zwischen FGly und einer synthetischen Gruppe eingesetzt werden.^[12] Als weitere Verbesserung wurde ein 1,2-dimethyliertes Hydrazin Derivat eingesetzt.^[12] Die final optimierte HIPS Ligation wird erfolgreich für die Produktion von ADCs eingesetzt. Diese stabilen Biokonjugate besitzen eine bis zu fünfmal höhere Serum-Halbwertszeit als die klassischen Oxim-Konjugate.^{[13][15]} Abbildung 2-16 zeigt die HIPS-Ligation. Die synthetische Gruppe die in das Protein oder Peptid eingeführt werden soll befindet sich an Position 1 am Indol.

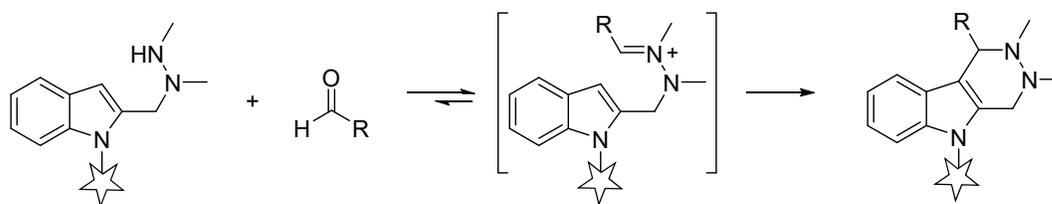


Abbildung 2-16 HIPS-Ligation: Das Dimethylhydrazin-Derivat des Indols reagiert mit einem Aldehyd zum Hydrazonium-Intermediat, welches durch den nukleophilen Angriff des Indolrings in Position 3 zum Konjugationsprodukt umgesetzt wird.^[12]

2.5.4 Die Knoevenagel-Ligation

Die Knoevenagel-Reaktion ist eine Abwandlung der Aldolreaktion, bei der Ketone und Aldehyde mit α,β -ungesättigten Verbindungen als Kohlenstoff-Nukleophil umgesetzt werden.^{[115][116]} Kurdika *et al.* haben eine Variante der Knoevenagel-Reaktion für die bioorthogonale Konjugation mit FGly entwickelt, die bei neutralen Bedingungen ohne einen Katalysator durchgeführt werden kann.^[16] Pyrazolone wurden bereits erfolgreich für die Funktionalisierung von reduzierenden Zuckern mit freiem Aldehyd eingesetzt. Bei dieser Reaktion kommt es jedoch zu einer zweifachen Addition des Pyrazolons,^[117] weshalb für die *trapped*-Knoevenagel-Ligation ein Pyrazolon mit einer Ethanthiol-Einheit eingesetzt wird. Das intermediäre Enon wird in einer 6-endo-trig-Reaktion abgefangen, wodurch die zweite Addition verhindert werden kann. Abbildung 2-17 zeigt die *trapped*-Knoevenagel-Ligation mit einem Pyrazolon. Die synthetische Gruppe, die in das Protein oder Peptid eingeführt werden soll, befindet sich an Position 1 im Pyrazolon. Das Pyrazolon liegt bevorzugt im Enol-Tautomer vor. Nach Bildung des Intermediates erfolgt der nukleophile Angriff des Thiols unter Ausbildung eines stabilen Sechsrings. Diese Reaktion kann bei einem neutralen pH-Wert ($\text{pH} = 7$) durchgeführt werden.^[16]

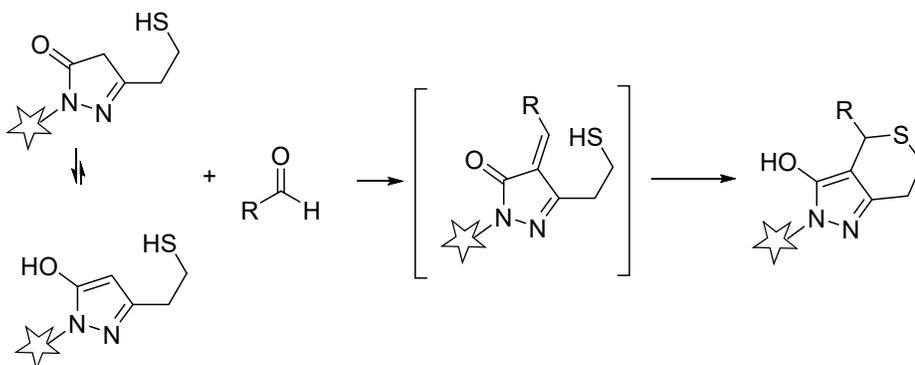


Abbildung 2-17 *trapped*-Knoevenagel-Ligation nach Kurdika *et al.*: Das Pyrazolon reagiert mit einem Aldehyd zum Intermediat. Dann erfolgt der intramolekulare nukleophile Angriff des Thiols und es wird ein stabiler Sechsring gebildet.^[16]

Ein Vergleich mit der Oxim-Ligation zeigt, dass nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden mit FGly die Ausbeute an Konjugationsprodukt für die *trapped*-Knoevenagel-Ligation bei 83% liegt. Die Ausbeute der Oxim-Ligation beträgt nach zwei Stunden 12%. Als weiterer Nachteil muss die Oxim-Ligation bei einem sauren pH-Wert (pH = 4.5) durchgeführt werden.^[16]

2.6 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate in der Tumor Therapie

Für das Jahr 2016 werden laut aktuellen Prognosen eine halbe Million neue Krebserkrankungen in Deutschland erwartet und jeder vierte Todesfall in 2012 war durch Krebs bedingt.^[118] Diese Zahlen verdeutlichen die Relevanz der Forschung an neuen Möglichkeiten für die Tumor Therapie. Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) kombinieren die Vorteile der breiten Anwendung und hohen Effizienz von zytostatischen Wirkstoffen mit der Selektivität von Antikörpern.^[119] 2014 befanden sich 47 verschiedene ADCs in klinischen Studien,^[120] was das hohe Interesse an dieser Wirkstoffklasse widerspiegelt.

Ein ADC besteht aus drei Bestandteilen. Zum einen aus dem Antikörper, der das krebs-spezifische Antigen bindet, zum anderen aus dem zytostatischen Wirkstoff der die Apoptose der malignen Zellen einleitet sowie aus einem Linker, der beide Einheiten verbindet. Abbildung 2-18 zeigt die schematische Darstellung eines ADCs. Der Antikörper zählt dabei zu einem der wichtigsten Faktoren für ein effektives Konjugat. Eine hohe Spezifität und Affinität zum Antigen wird benötigt, damit es nicht zu Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen kommt. Bei einer unspezifischen Bindung würde der zytostatische Wirkstoff in gesundes Gewebe gelangen und das therapeutische Fenster des ADCs würde sich damit verringern.^{[121][122]} Weiterhin ist es für die Eigenschaften des ADCs wichtig, ob die Bindung des Antikörpers am Antigen eine Rezeptor-vermittelte Endocytose auslöst. Antikörper wie hR3 (Nimotuzumab) werden von malignen Zellen internalisiert und eignen sich somit für die Tumorthherapie.^[123]

Die nächste wichtige Komponente eines ADCs ist der Linker zwischen Antikörper und Wirkstoff. Ein idealer Linker ist im Blutkreislauf stabil und setzt den Wirkstoff effizient innerhalb der malignen Zellen frei.^[124] Momentan werden spaltbare und permanente Linker für die Tumorthherapie erprobt. Säurelabile Linker sind darauf ausgelegt, dass die Bindung im Blutkreislauf bei einem neutralen pH-Wert stabil ist. Nach der Internalisierung des ADCs erfolgt die Spaltung in den Endosomen (pH 5.5–6.2) oder Lysosomen (pH 4.5–5.0), wo ein saurer pH-Wert vorliegt.^[125] Für diese Strategie werden z. B. Hydrazone^[125] oder Silyl-Ether erprobt.^[126] Für das ADC Gemtuzumab Ozogamicin (*Mylotarg*) welches 2010 vom Markt genommen wurde, wird ein Hydrazon-Linker eingesetzt.^[127] Häufig werden enzymatisch spaltbare Linker verwendet. Sie enthalten Struktur motive, die von lysosomalen Proteasen erkannt und gespalten werden. Für Brentuximab Vedotin (*Adcetris*) werden die Aminosäuren Valin-Citrullin benutzt. Diese Sequenz wird von der Protease Cathepsin B erkannt und gespalten.^[128] Die dritte Strategie für spaltbare Linker setzt Disulfide ein, welche

innerhalb der Zellen durch Glutathion reduziert werden, wodurch der Wirkstoff freigesetzt wird.^[129] Ein Vorteil dieser Techniken ist es, dass auch benachbarte Zellen durch den Wirkstoff angegriffen werden können. Nach der Spaltung des Linkers können die Wirkstoffe die Membran passieren und so sekundäre Tumorzellen bekämpfen.^[130] Permanente Linker sind im Blutkreislauf sehr stabil, jedoch ist eine effiziente Internalisierung des ADCs nötig, damit der Wirkstoff sein Ziel erreicht. In den Lysosomen wird der Antikörper proteolytisch abgebaut und der Wirkstoff kann abschließend die Apoptose der Zelle einleiten.^[131]

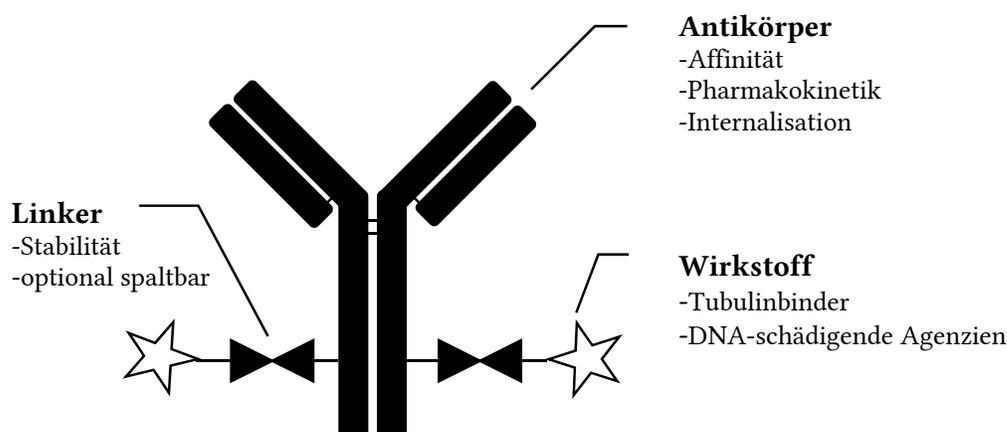


Abbildung 2-18 Aufbau eines ADCs: Die wichtigsten Komponenten sind der Antikörper, der Linker sowie der Wirkstoff.^[32]

Insgesamt erreicht nur ein sehr geringer Prozentsatz (0.003-0.008%) des verabreichten ADCs die Tumorzelle.^[132] Daher werden potente Zytostatika benötigt, die in subnanomolaren Konzentrationen effektiv sind. Weiterhin ist für eine kovalente Bindung zum Linker eine geeignete funktionelle Gruppe am Zytostatikum nötig. Die Zytotoxizität des Wirkstoffes sollte durch die Konjugationsreaktion nicht beeinflusst werden. Verschiedene Wirkstoffe werden für die Entwicklung von ADCs erprobt. Es kommen Tubulinbinder wie Auristatine und Mytansinoide sowie DNA-schädigende Agenzien wie Duocarmycin und Pyrrollobenzodiazepine zum Einsatz. Weiterhin werden Polymerase II Inhibitoren wie α -Amanitin verwendet.^[32]

2.6.1 Das Formylglycin-generierende Enzym für die Produktion von ADCs

Aktuell sind die ADCs Brentuximab Vedotin (*Adcetris*) und Trastuzumab Emtansin (*Kadcyla*) für die Chemotherapie zugelassen. Bei beiden ADCs handelt es sich aufgrund der Konjugationsstrategie um ein heterogenes Gemisch.^[6] Für Adcetris wird die Thiol-Michael Addition mit reduzierten Cystein-Resten eingesetzt während für Kadcyla Lysin-Reste mit NHS-Aktivestern umgesetzt werden. (Abschnitt 2.1.1) Somit kommt es zu variierenden Wirkstoff/Antikörper-Verhältnissen (DAR). Die DAR liegt bei Adcetris zwischen 0 und 8^[41] und bei Kadcyla zwischen 1 bis 8.^[45] Eine von vielen Strategien, die in der aktuellen Forschung verfolgt werden, um eine definierte DAR zu erreichen, ist die chemoenzymatische Konjugation unter Einsatz von FGE.^[3] FGE katalysiert die

ortsspezifische Oxidation des Cysteinrestes in dem Erkennungsmotiv (C-x/T-P-x/S-R).^{[65][66]} (Abschnitt 2.3.4) In Folge dessen kann die HIPS-Ligation^[113] oder die *trapped*-Knoevenagel-Ligation^[27] (Abschnitt 2.5) verwendet werden um ADCs mit einer homogenen DAR zu erzeugen.^[13] Für die Generierung des Aldehyds wird z. B. die Sequenz LCTPSR eingesetzt. Mit Hilfe von etablierten molekularbiologischen Methoden kann die Anzahl und Position der Erkennungssequenzen variiert werden. Hierdurch werden im Vergleich zu der Konjugation über Lysin- und Cystein-Reste zwei entscheidende Vorteile erzielt. So ist die DAR, als auch die Position der Wirkstoffmoleküle direkt steuerbar. Dadurch kann verhindert werden, dass die Pharmakokinetik des Antikörpers durch die Konjugation negativ beeinflusst wird.^{[12][15][18]}

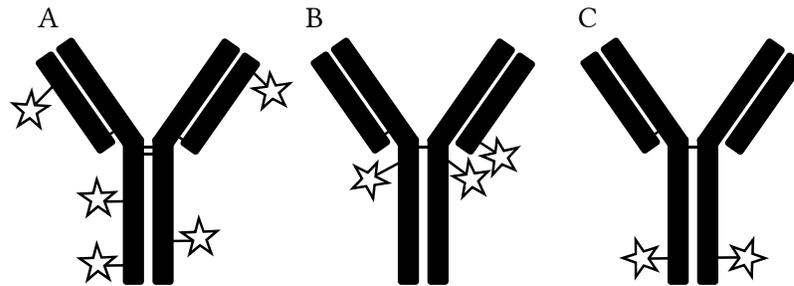


Abbildung 2-19 Ortsspezifische Konjugation durch FGE: (A) Durch die Konjugation mit Lysinen entsteht eine hohe Heterogenität, da verschiedene Lysin-Reste zugänglich sind. (B) Für die Konjugation an Cystein-Reste ist zunächst eine partielle Reduktion der Disulfide nötig. Nach der Thiol-Michael-Addition kommt es ebenfalls zu einem Produktgemisch. (C) Durch die chemoenzymatische Konjugation mit FGE kann ein homogenes Produkt erhalten werden. Die Anzahl und Position der Wirkstoffmoleküle lässt sich durch die Erkennungssequenzen steuern.^{[32][13]}

Besonders die Konjugation von Wirkstoffmolekülen an der variablen leichten (V_L) oder schweren (V_H) Kette kann einen negativen Einfluss auf die Affinität des ADCs haben. Die Position der Konjugation beeinflusst weiterhin die Stabilität des Konjugates. Eine nicht geeignete Position für die Bindung zum Wirkstoff kann zur Aggregation des ADCs führen oder die Bindungseigenschaften des Antikörpers beeinträchtigen.^[13]

2.6.2 EGFR als Antigen für FGly-Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

Neben den in Abschnitt 2.6 beschriebenen Bausteinen des ADCs, Antikörper, Linker und Toxin ist zusätzlich das Antigen für ein erfolgreiches Konjugat entscheidend. Ein ideales Antigen ist auf der Zelloberfläche lokalisiert, damit der Antikörper ungehindert das Antigen binden kann.

Eine unterschiedlich starke Expression in Tumor- und gesunden Zellen wird benötigt, damit das ADC eine ausreichende Selektivität für die Tumorzelle besitzt. Eine zu hohe Expression in gesundem Gewebe führt zu einer Aufnahme des Wirkstoffes in andere Zelltypen und somit zu stärkeren Nebenwirkungen. Die mittlere letale Dosis

sinkt und somit auch der therapeutische Quotient aus mittlerer letaler Dosis und mittlerer Effektivdosis.^{[32][133]}

Der EGF-Rezeptor (EGFR) wird auf vielen Tumorzellen überexprimiert. Auf vielen Epithel-Tumorzellen sind bis zu $2 \cdot 10^6$ EGF-Rezeptoren lokalisiert.^[134] Im Vergleich hierzu liegt die Expression in gesundem Gewebe zwischen $4 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ Rezeptoren pro Zelle.^[135] Daher ist der EGFR ein häufig adressiertes Ziel in der Tumor-Therapie, sodass bereits verschiedene Antikörper, die gegen EGFR gerichtet sind wie Cetuximab^[136] und Matuzumab^[137] in der aktuellen Forschung evaluiert werden.

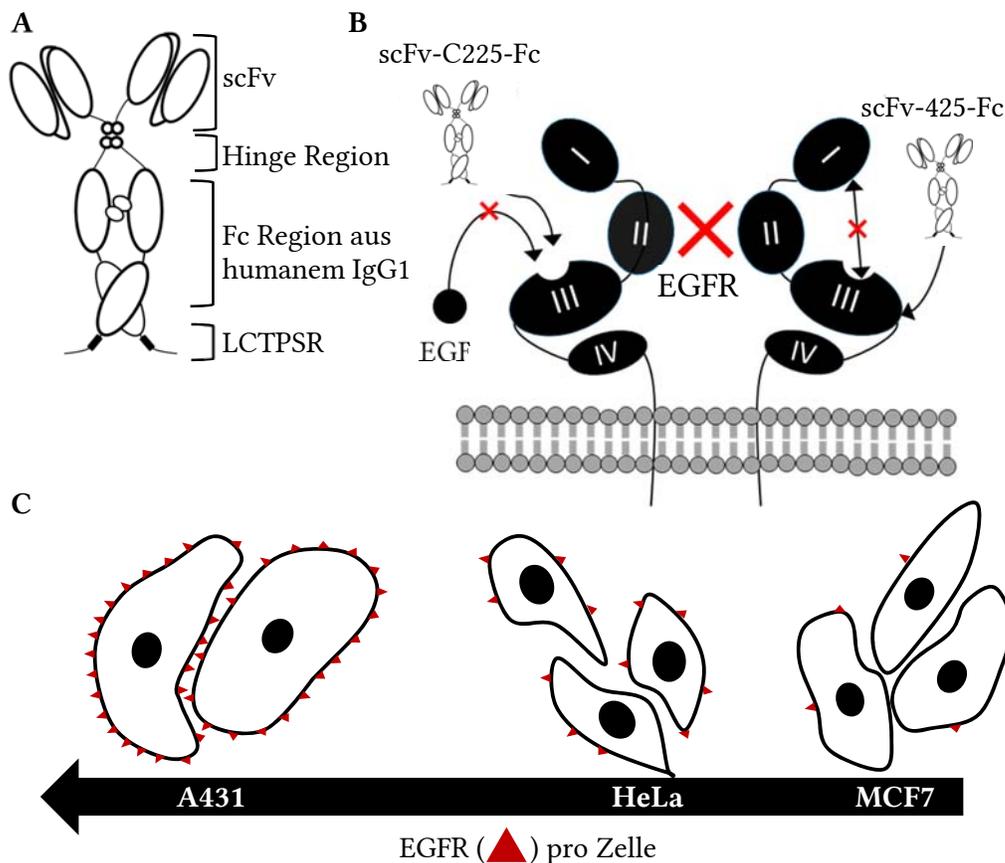


Abbildung 2-20 Antikörperfragmente gerichtet gegen EGFR: (A) Zeigt den Aufbau der Antikörperfragmente scFv-C225-Fc und scFv-425-Fc bestehend aus der scFv Region von Cetuximab^[136] und Matuzumab^[137]. Diese ist über eine Hinge Region mit dem Fc Teil aus humanem IgG1 verbunden.^[138] In (B) ist der Aufbau des EGFR gezeigt.^[139] Beide Antikörperfragmente binden Domäne III und verhindern die Dimerisierung der Tyrosin-Kinase. Aufgrund der verschiedenen Bindestellen innerhalb von Domäne III könnte der kombinierte Einsatz beider Fragmente möglich sein. (C) Zeigt die Expression von EGFR auf der Oberfläche von verschiedenen Zelllinien. (Abbildung basierend auf G. Falck *et al.*^[140])

Müller *et al.* entwickelten Antikörperfragmente basierend auf Ab425 (Matuzumab)^[141] und C225 (Cetuximab). Wie in Abbildung 2-20 dargestellt bestehen diese Antikörperfragmente aus einem *single chain variable fragment* (scFv)^[142] des jeweiligen Antikörpers, welche über eine Hinge Region mit dem Fc Teil aus humanem IgG1

verbunden sind.^{[138][143]} Beide Konstrukte binden die Domäne III von EGFR, aber an unterschiedlichen Epitopen. Das Antikörperfragment scFv-C225-Fc basierend auf Cetuximab bindet kompetitiv an der EGF-Bindestelle und das Antikörperfragment scFv-425-Fc basierend auf Matuzumab außerhalb der EGF-Bindestelle. Somit ist der kombinierte Einsatz beider Fragmente möglich. Durch die Antikörperfragmente wird die Dimerisierung der Tyrosin-Kinase EGFR verhindert.^[137] Eine Evaluierung der potentiellen ADCs basierend auf scFv-C225-Fc und scFv-425-Fc ist durch verschiedene Zelllinien möglich. So zeigen z.B. die Zelllinien A431, HeLa und MCF7 deutlich unterschiedliche Expressionslevel an EGRF, wodurch es möglich ist, Selektivitätsprofile zu erhalten.

3. Zielsetzung

Die spezifische Konjugation von synthetischen Molekülen mit Peptiden und Proteinen bildet die Grundlage für neue Forschungsschwerpunkte und Anwendungen in der Chemischen Biologie. Ein Beispiel ist die Etablierung neuer zielgerichteter Strategien für die Krebstherapie, durch die Konjugation von Antikörpern mit Zytostatika.^[144] Für diese Anwendungen sind chemoselektive Reaktionen und neue Konjugationsstrategien essentiell, um den begrenzten Pool der 21 proteinogenen Aminosäuren zu erweitern.^[28] Eine Möglichkeit hierfür bietet das C^α-Formylglycin-generierende Enzym (FGE), welches einen Cystein-Rest innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz zum Aldehyd (C^α-Formylglycin, FGly) oxidieren kann.^[2] Die Carbonylgruppe von Aldehyden ist aufgrund Ihrer Reaktivität als Elektrophil für bioorthogonale Reaktionen hervorragend geeignet. Daher soll in dieser Arbeit eine chemoenzymatische Strategie eingesetzt werden, um Peptide und Proteine mittels FGE zu derivatisieren.

Es wurde geplant in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. T. Dierks die Produktion von zwei FGE-Spezies zu etablieren und optimieren. Die Expression des eukaryotischen FGE (AS 73-374, ΔFGE) soll in *High Five* Insektenzellen durchgeführt werden. Darüber hinaus könnte das prokaryotische FGE aus *Mycobacterium tuberculosis* (AS 2-299, mtbFGE) rekombinant heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Nach erfolgreicher Reinigung dieser Enzyme müssen die optimalen Bedingungen für die Biotransformation von Peptiden und Proteinen mit ΔFGE und mtbFGE untersucht werden. Im Zuge dessen soll auch die Immobilisierung von mtbFGE, für die Enzymstabilisierung, erprobt werden.

Nach ersten Überlegungen ist es sehr wahrscheinlich, dass das stereogene Zentrum des C^α-Formylglycins leicht epimerisiert. Da es sich bei FGly um eine 1,3-Dicarbonylverbindung handelt, ist dies unvermeidbar. Um aufzuklären, ob neben der Aldehyd-Form von FGly, wie im Transesterifizierungsmechanismus für die Sulfatesterspaltung postuliert,^[61] eine Diol-Form vorliegt, müssen die FGly-Peptide spektroskopisch charakterisiert werden. Im letzten Schritt soll untersucht werden, ob die Aldehyd-Peptide durch Wittig-Reaktionen mit stabilisierten Yliden umgesetzt werden können, um Peptide mit neuen funktionellen Gruppen zu synthetisieren.

In einem weiteren Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. K. Müller sollen für die Entwicklung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs) Antikörperfragmente *in vitro* mit mtbFGE oder *in vivo* mit ΔFGE umgesetzt werden. Für eine erste Evaluierung dieser FGly-Antikörperfragmente soll der Aldehyd mit der in Arbeiten von D. Rabuka *et al.* beschriebenen HIPS-Ligation^[12] oder Knoevenagel-Ligation^[27] mit einem Fluorophor markiert werden. Die Synthese dieser Bausteine ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Nach der Fluoreszenzmarkierung und Reinigung der Antikörperfragmente könnte mikroskopisch untersucht werden, ob die Antikörperfragmente erfolgreich das Antigen, den EGF-Rezeptor, binden. Für diese Experimente werden verschiedene Zelllinien mit einer unterschiedlich hohen EGFR-Expression eingesetzt. Für die Wirksamkeit der Antikörperfragmente ist es wichtig, ob es nach Bindung von EGFR zu einer Internalisierung des Rezeptors und der Antikörperfragmente kommt.

4. Material

4.1 Laborausstattung

Gerät	Hersteller
Äkta Explorer 10S	GE Healthcare, München
Analysewaage XA205 <i>Dual Range</i>	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Analysewaage, <i>Classic</i>	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Analysewaage, Pioneer PA4102	Ohaus Corporation, Parsippany (USA)
APEX III FTICR-MS	Bruker Daltonics, Bremen
Autoklav 2540 ELV	Systec GmbH, Münster
Kamera LAS 3000	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
CO ₂ -Inkubator, Heraeus HeraCell	Thermo Electron, Langenselbold
CO ₂ -Inkubator, SteriCult	Forma Scientific, Waltham (USA)
Dampfsterilisator, Webeco Automat	Webeco, Süssstedt
Dampfsterilisator, Laboklav 160 MSL	Steriltechnik AG, Magdeburg
Drehrad	Heidolph Elektro GmbH, Keilheim
Drehinkubator, Stuart SRT1	Stone, Staffordshire (England)
Eismaschine	Ziegra-Eismaschine, Isernhagen
Elektrophoresekammern für DNA-Agarosegele	Mechanische Werkstatt der Universität Bielefeld
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Mechanische Werkstatt der Universität Bielefeld
Ettan LC	GE Healthcare, München
Esquire 3000 ESI-MS	Bruker Daltonics, Bremen
Fluoreszenzfilter FL-Y515	Fuji Photo Film, Düsseldorf
Gefriertrocknungsanlage Christ alpha	Martin Christ GmbH, Osterode
HPLC LaChrom	Merck-Hitachi, San Jose (USA)
HPLC Accela	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Inkubationsschüttler Innova 4300	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Inkubationsschüttler Roto Shake Genie	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA Labortechnik, Staufen
Messpipetten, Glas, 5 mL, 10 mL, 20 mL	Hirschmann Laborgeräte, Eberstedt

Gerät	Hersteller
Mikroliterpipette, manuell 0.1-2.5 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroliterpipetten, manuell, variable Volumina	Gilson International BV, Limburg
Mikrotiterplatten-Lesegerät, Tecan M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Mikrowellen Peptidsynthesizer Liberty	CEM, Kamp-Lintfort
Milli-Q-POD Wasserreinigungsanlage	Millipore GmbH, Schwalbach
Multipette Stream	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop ND-2000 c	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Netzgerät PowerPac 300/1000	BioRad Laboratories GmbH, München
NMR Spektrometer Bruker Avance III 500	Bruker Daltonics, Bremen
NMR Spektrometer Bruker DRX 500	Bruker Daltonics, Bremen
NMR Spektrometer Bruker Avance 600	Bruker Daltonics, Bremen
PCR Thermocycler Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen
PCR-Gerät, Primus 96 advanced	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Peristaltische Pumpe, P1	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
pH-Messgerät SevenMulti	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstedt
Präzisionswaage Labstyle 3002	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Rotationsvakuumpkonzentrator, SpeedVac RVC 2-18	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode
Säule Hypersil Gold C ₁₈ , 3 µm, 150×2.1 mm	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Säule Hypersil Gold C ₁₈ , 8 µm, 250×21 mm	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Schüttler	Mechanische Werkstatt der Universität Bielefeld
SLM Aminco French Press	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Spritzenpumpe Modell 200	KD Scientific, Holliston (USA)
Sterilisator SHP Laboklav 160 MSLV-TA	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss
Sterilisator, AutoklavCS-Labor II	Webeco, Süsstedt
Sterilwerkbank, CleanAir, DLF/BSS6	C-TecCleanroom Technology, Rottenburg
Sterilwerkbank, Heraeus HERAsafe	Thermo Electron, Langenselbold

Gerät	Hersteller
Sterilwerkbank, Holten LaminAir	C-TecCleanroom Technology, Rottenburg
Thermomixer 5436, 1.5 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer comfort 0.5 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Transilluminator	Peqlabs Biotechnologie GmbH, Erlangen
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
UltrafleXtreme	Bruker Daltonics, Bremen
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic GmbH, Berlin
Ultraschallgerät, Branson Sonifier 450	G.Heinemann Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Ultra-Tiefkühltruhe -152 °C	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf
Ultra-Tiefkühltruhe -86 °C	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf
UV-2450-Spektrophotometer	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
UV-Spektrometer Helios	Spectronic Unicam, Leeds (UK)
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich (Schweiz)
Wasserbad	MS Laborgeräte, Wiesloch
Zellzählgerät Cedex XS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zentrifuge, Sorval RC5B inkl. Rotor GS 3	duPont Company, Newton (USA)
Zentrifuge, Eppendorf 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Eppendorf 5424	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Eppendorf 5804	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Eppendorf 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Thermo Electron, Langenselbold
Zentrifuge, Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg
ZQ 2000 LC-MS	Waters, Milford (USA)

4.2 Weitere Materialien

Material	Hersteller
96-well Platten, transparent, flacher Boden	Greiner, Solingen
Amicon® Ultra-4 bzw. Ultra-15 Zentrifugal- filter, 10 K, 50 K, 100 K	Millipore GmbH, Schwalbach
HisTrap FF, 1 mL, 5 mL Säule	GE Healthcare, München
HiTrap 1 mL Säule	GE Healthcare, München
Küvette (Typ 104.002B-QS)	Hellma Analytics, Müllheim
Küvetten, Plastik 1 mL	Sarstedt AG, Nümbrecht
Mikroskop 8 <i>well slides</i> , 1 µ Glasboden	Ibidi, Martinsried
Nitrocellulose Protran BA85	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Pasteurpipetten, Glas, 5 bis 20 mL	Brand GmbH, Wertheim
Pasteurpipetten, Kunststoff 5 bis 50 mL	Sarstedt AG, Nümbrecht
Pipettenspitzen Bio-One 10 µL	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen, Omnitip FastRack 1 mL, 200 µL, 10 µL	UL Plast, Warschau (Polen)
ResourceQ, 1 mL Säule	GE Healthcare, München
Roti PVDF-Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Säulenmaterial, Ni ²⁺ -NTA-Sepharose	Qiagen GmbH, Hilden
Spritzenaufsatzfilter, Filtropur 0.2 µm	Sarstedt AG, Nümbrecht
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare, München
Targethalterung	Bruker Daltonics, Bremen
<i>Target Ground Steel</i>	Bruker Daltonics, Bremen
<i>Target Polished Steel</i>	Bruker Daltonics, Bremen
<i>Target AnchorChip</i>	Bruker Daltonics, Bremen
Whatman Blot-Filterpapier	Schleich und Schüll GmbH, Dassel
Zellkultur Flaschen, Nuclon Δ Surface T25 und T75	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkultur Flaschen 250 mL, PC 50/CS	Cole-Parmer, Vernon Hills, IL (US)
ZipTip® Pipettenspitzen µC18 und C18	Millipore GmbH, Schwalbach

4.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien und Lösungsmittel werden in angemessener Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich, VWR, Carl Roth, Acros Organics, Merck und AppliChem bezogen. Spezielle Chemikalien und Formulierungen sind im Folgenden aufgelistet:

Chemikalie	Hersteller
Alizarinrot	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Bradford Reagenz	SERVA Feinbiochemika, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA) >99 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
CellMask™ rot	Thermo Fischer, Schwerte
Chelex-100 Matrix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Coomassie Brilliant Blue G250	SERVA Feinbiochemika, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FKS)	Lonza, Köln
Gibco DMEM (4,5 g/L Glucose) Pulver	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glutathion, reduziert	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Complete</i> Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kanamycinsulfat	AppliChem, Darmstadt
LysoTracker™ blau DND-22	Thermo Fischer, Schwerte
Peptidstandard-MS CeBiTec	CeBiTec, Bielefeld
Peptidstandard-MS 1000-3500 Da	Bruker, Bremen
Proteinstandard-MS 20 kDa-50 kDa	Bruker, Bremen
Rotiphorese A 30 % Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese B 2 % Bisacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sinapinsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer	Thermo Fischer Scientific, Rockford (USA)
SuperSignal® West Pico stable peroxide	Thermo Fischer Scientific, Rockford (USA)
Trypanblau-Lösung (4 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin / EDTA (1x)	Lonza, Köln

4.4 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Doxycyclin	Kapa Biosystems, Wilmington (USA)
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching (Österreich)

4.5 Kits

Kit	Hersteller
BacMagic DNA Kit (Novagen)	Merck Millipore, Darmstadt
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	Kapa Biosystems, Wilmington (USA)
QIAGEN plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAPrep spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden

4.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>DpnI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
KAPA HiFi HotStart	Kapa Biosystems, Wilmington (USA)
Trypsin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DNaseI	Roche, Basel (Schweiz)

4.7 Antikörper und HRP-Konjugate

Antikörper	Ursprung	Konzentration	Verdünnung	Hersteller
α -His ₆ monoclonal (HIS.H8)	Maus	1 mg/mL	1:3000	ThermoFischer
A-Maus.IgG HRP-Konjugat	Ziege	1 mg/mL	1:10 000	Invitrogen

4.8 DNA und Protein Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
Protein Marker, <i>Precision Plus Protein Standards, All Blue</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Protein Marker, <i>Precision Plus Protein Standards, Dual Color</i>	Bio-Rad Laboratories, München
DNA Marker 1 kb	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

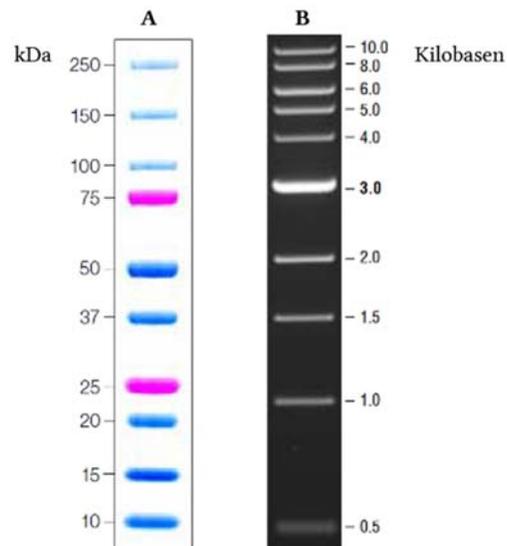


Abbildung 4-1: Darstellung der verwendeten Größenstandards für die Elektrophorese. **(A)** 10 μL *Precision Plus Protein Marker* nach Auftrennung durch SDS-PAGE. **(B)** 5 μg 1kb DNA Marker aufgetragen im 0.8% TAE-Agarosegel und mit Ethidiumbromid gefärbt

4.9 Oligonukleotid Primer

Die eingesetzten Primer werden von der Firma Eurofins Genomics als salzfreies Lyophilisat bezogen.

Bezeichnung	5'-3'Nukleotidsequenz
T7-Terminator Primer für die Sequenzierung von pET Vektoren	
T7P	TAATACGACTCACTATAGGG
T7T	CTAGTTATTGCTCAGCGG
Primer für die Mutagenese-PCR von mtbFGE	
mtbFGE_LCTPSR_A	AGCAGCGGCCTGTGCACCCCGAGCAGAGTGCCGCGCGGC
mtbFGE_LCTPSR_B	GCCGCGGGCACTCTGCTCGGGGTGCACAGGCCGCTGCT

4.10 Plasmide

Plasmid	Hersteller
pAcGP67-B-AIKa- Δ 72FGE	K. Radhakrishnan Universität Bielefeld
pET14b-mtbFGE	Redwood Bioscience, St. Emeryville
pET14b-mtbFGE-LCTPSR	diese Arbeit

4.11 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp und Phenotyp	Hersteller
<i>E.coli</i> DH5 α , chemisch- oder elektrisch-kompetent	SupE44, Δ lac 169 (Φ 80 lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, rel A1	Stratagene, Karlsruhe
<i>E.coli</i> BL21(DE3), chemisch- oder elektrisch-kompetent	B F; dcm, ompT, hsdS (rB- mB-), gal(DE3)	Novagen, Darmstadt

4.12 Medien für die Kultivierung von *E. Coli*

LB-Medium und LB-Agar werden autoklaviert (121 °C, 20 min) und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Zugabe des Antibiotikums erfolgt nach dem Abkühlen oder kurz vor der Verwendung.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1.0 % (w/v) Trypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 0.5% (w/v) NaCl in dH ₂ O
LB-Agar	1.0 % (w/v) Trypton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 0.5 % (w/v) NaCl 1.2 % (w/v) Agar Agar in dH ₂ O
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton 0.5% (w/v) Hefeextrakt 8.6 mM NaCl 2.5 mM KCl 20 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose in dH ₂ O

4.13 Zelllinien

Bezeichnung	Informationen
HeLa	Zelllinie aus humanen Epithelzellen eines Zervix Karzinoms, ACC 57
KB-3-1	Zelllinie aus humanen Epithelzellen eines Zervix Karzinoms MDR, ACC 158
MCF7	Zelllinie aus humanen Epithelzellen eines metastasierenden Mammakarzinoms, ACC 115
A431	Zelllinie aus humanen Plattenepithelkarzinom, ACC 91
<i>High Five</i> (BTI-TN-5B1-4)	Ovarial-Zelllinie aus <i>Trichoplusia ni</i> ,
Sf9	Ovarial-Zelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i> , ACC 125

4.14 Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung/Hersteller
BacVector Insektenzellmedium	Merck Millipore, Darmstadt
DMEM-Medium pH 7.3	13.38 g DMEM-Fertigpulver 3.4 g NaHCO ₃ 8 mM HCl 0.1 g Phenolrot 2 mM L-Glutamin 10 % FCS FCS auf 1 L mit dH ₂ O auffüllen
Express Five SFM	Gibco, Karlsruhe
SF 900 II SFM	Gibco, Karlsruhe
RPMI-Medium	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)

4.15 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen werden mit Milliporewasser angesetzt. Für die Einstellung der pH-Werte wird 1 M HCl oder 1 M NaOH verwendet. Die Puffer werden abschließend steril filtriert und falls erforderlich durch Ultraschall entgast.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
AEC-Bindepuffer, pH 8	20 mM Tris/HCl 20 mM NaCl
AC-Elutionspuffer, pH 8	20 mM Tris/HCL 1.0 M NaCl
AMPD-Aktivitätspuffer, pH 9.3	150 mM AMPD 200 mM NaCl 45 µM CaCl ₂
Blotpuffer (Anode), pH 7.4	75 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Blotpuffer (Kathode), pH 9.0	40 mM ε-Aminocaprinsäure 25 mM Tris/HCl
Bicin-Aktivitätspuffer, pH 9.3	150 mM Bicin 200 mM NaCl 45 µM CaCl ₂
Bicin-Aktivitätspuffer, pH 9.3	150 mM Bicin 200 mM NaCl 50 µM CuSO ₄

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Coomassie-Färbelösung	20 % (v/v)	Methanol
	20 % (v/v)	Roti-Blue (5 x)
Coomassie-Fixierlösung	40% (v/v)	Ethanol
	20% (v/v)	Essigsäure
DNA-Ladepuffer (6x)	6 mM	EDTA
	93 mL	Glycerin (87%)
	0.3 g	Bromphenolblau
	0.3 g	Xylen Cyanol FF auf 250 mL mit dH ₂ O
HIPS-Ligation Puffer, pH 6	0.2 M	Arginin in PBS
IMAC-Bindepuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
IMAC-Elutionspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
Lämmli-Puffer (4x) –SH	10 g	SDS
	40 mL	1 M Tris/HCl, pH 6.8
	50 mL	Glycerin (87%)
	50 mg	Bromphenolblau auf 125 mL mit dH ₂ O
Lämmli-Puffer (4x) +SH	10 g	SDS
	40 mL	1 M Tris/HCl, pH 6.8
	50 mL	Glycerin (87%)
	50 mg	Bromphenolblau
	20 % (v/v)	β-Mercaptoethanol auf 125 mL mit dH ₂ O
mtbFGE-Lagerpuffer pH 8	0.2 M	Arginin in PBS
MTGC-Puffer (1x) pH 6 bis 12	150 mM	MOPS
	150 mM	Tris/HCl
	150 mM	Glycin
	150 mM	CAPS
	200 mM	NaCl
	45 μM	CaCl ₂
PBS (1x), pH 7.3	137 mM	NaCl
	2.7 mM	KCl
	10 mM	NaH ₂ PO ₄
	1.7 mM	KH ₂ PO ₄
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	0.25 mM	Tris/HCl
	1.92 mM	Glycin
	1 % (w/v)	SDS

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
SDS-Polyacrylamid-Sammelgel 5%	800 μ 550 μ L 1.25 mL 2.35 mL 50 μ L 5 μ L 20 μ L	30 % Acrylamid Lösung 1 % Bis-Acrylamid Lösung 0.5 M Tris-Puffer, pH 6.8 dH ₂ O 10 %ige SDS-Lösung TEMED 25 %ig APS
SDS-Polyacrylamid-Trenngel 12.5%	7.3 mL 1.15 mL 4.40 mL 4.47 mL 175 μ L 14.6 μ L 58 μ L	30 % Acrylamid Lösung 1 % Bis-Acrylamid Lösung 0.5 M Tris-Puffer, pH 6.8 dH ₂ O 10 %ige SDS-Lösung TEMED 25 %ig APS
SDS-Polyacrylamid-Trenngel 15%	8.75 mL 1.37 mL 4.38 mL 2.77 mL 175 μ L 14.6 μ L 58 μ L	30 % Acrylamid Lösung 1 % Bis-Acrylamid Lösung 0.5 M Tris-Puffer, pH 6.8 dH ₂ O 10 %ige SDS-Lösung TEMED 25 %ig APS
SEC-Laufpuffer, pH 8.0	20 mM 200 mM	Tris/HCl NaCl
SEC-Laufpuffer, pH 7.4	0.2 M	Arginin in PBS
<i>Stripping</i> -Lösung	0.5 M 3.2 % (v/v)	NaCl Essigsäure
TAE-Puffer(50x)	2.0 M 1.5 M	Tris/HCl NaCl
Taurin-Aktivitätspuffer	150 mM 200 mM 45 μ M	Taurin NaCl CaCl ₂
TBS (1x), pH 7.4	50 mM 15 mM	Tris/HCl NaCl
Tris-Aktivitätspuffer (3x) pH 7.3 oder pH 9.3	150 mM 200 mM 45 μ M	Tris/HCl NaCl CaCl ₂

4.16 Matrix für MALDI-ToF-MS

Matrix	Zusammensetzung
DHB	10 mg/mL 2,5 Dihydroxybenzoesäure 0.5% TFA in dH ₂ O/ACN
2,4-DNPH	10 mg/mL 2,4-Dinitrophenylhydrazin 0.5 % (v/v) TFA in dH ₂ O/ACN, 1:1
HCCA	40 µL α-Cyanohydroxymizsäure gesättigte Lösung in Aceton 10 µL Nitrozellulose 10 mg/mL in Isopropanol/Aceton, 1:1
Sinapinsäure	40 µL Sinapinsäure, gesättigte Lösung in Aceton 10 µL Nitrocellulose 10 mg/mL in Isopropanol/Aceton

4.17 Verwendete Software

Programm	Anwendung	Vertreiber
AIDA	CCD-Kamera	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
BioTools 3.0	MS/MS-Auswertung	Bruker Daltonics, Bremen
ccpNMR	Auswertung von 2D NMR-Spektren	Freeware, http://www.ccpn.ac.uk/v2-software/software/analysis
ChemDraw Professional 15.1	Strukturformeln	PerkinElmer, Waltham (USA)
Compute pI/MW	Berechnung theoretischer isoelektrischer Punkte	Freeware, http://web.expasy.org/compute_pi/
FlexAnalysis 3.3	MS- bzw. MS/MS-Auswertung	Bruker Daltonics, Bremen
FlexControl	Steuerung UltrafleXtreme	Bruker Daltonics, Bremen
i-control	Tecan	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
ImageJ	Bildbearbeitung	Freeware, http://imagej.nih.gov/ij/
MestreNova 8.1	MS und NMR Auswertung	Mestrelab Research, Santiago de Compostela (Spanien)
OriginPro	Statistiksoftware	OriginLab, Northhampton (USA)
PeptideCutter	Vorhersageprogramm potentieller Protease-schnittstellen	Freeware, http://web.expasy.org/peptide_cutter

Programm	Anwendung	Vertreiber
PeptideMass	Berechnung von Peptidmassen nach enzymatischer Spaltung	Freeware, http://web.expasy.org/peptide_mass/
PyMOL 1.5.0.1	Darstellung von Biomolekülen	Freeware, http://www.pymol.org
Serial Cloner 1.3	Auswertung von DNA-Sequenzierungsergebnissen	Freeware, http://serialbasics.free.fr
Unicorn	Äkta Explorer 10S und Ettan	Äkta Explorer 10S und Ettan
ZEN	CLSM	Carl Zeiss, Jena

5. Experimenteller Teil

5.1 Chemische Arbeiten

5.1.1 Allgemeines

Arbeiten unter inert Bedingungen

Experimente, bei denen der Ausschluss von Feuchtigkeit oder Sauerstoff erforderlich ist, wurden mittels der Schlenktechnik unter Argonatmosphäre durchgeführt. Die verwendeten Reaktionsapparaturen wurden im Vakuum bei 0.02 mbar mehrfach ausgeheizt und anschließend mit über Sicapent getrocknetem Argon der Qualitätsstufe 4.6 (99.9996 %) befüllt.

Lösungsmittel und Reagenzien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden in angemessener Qualität bezogen und entweder ohne weitere Reinigung eingesetzt, oder wie im Folgenden beschrieben gereinigt oder getrocknet. Sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindliche, sowie getrocknete Chemikalien und Lösungsmittel wurden unter Argon, wenn nötig gekühlt, gelagert. Benzaldehyd, Benzylbromid und Oxalylchlorid wurden vor der Verwendung frisch destilliert. Die Lösemittel Petrolether und Ethylacetat wurden in technischer Qualität bezogen und vor Gebrauch destilliert. Dichlormethan wurde über Kaliumcarbonat destilliert. Dimethylformamid wurde über Ninhydrin im Vakuum destilliert. Lösungsmittel für Reaktionen unter inert Bedingungen wurden wie folgt absolutiert:

Ethylacetat – Destillation über K_2CO_3 , Aufbewahrung über Molekularsieb 4 Å

Dichlormethan - Destillation über CaH_2

Ethanol – Destillation über Magnesium, Aufbewahrung über Molekularsieb 3 Å

Methanol – Destillation über Magnesium, Lagerung über Molekularsieb 3 Å

Tetrahydrofuran - Destillation über Natrium mit Benzophenon

Toluol - Destillation über Natrium

Für Lösungen und Waschen von Phasen wurde deionisiertes Wasser verwendet, welches mit der Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE MILLI-Q entsalzt und gereinigt wurde.

Evaporieren von flüchtigen Bestandteilen

Lösemittel aus Extrakten und Reaktionsgemischen wurden zunächst am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck und bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt. Die weitere Trocknung erfolgte im Vakuum (HV, ≤ 0.03 mbar).

Säulenchromatographie

Als stationäre Phase für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40-63 μm (230-400 mesh) von der Firma MACHEREY-NAGEL eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel 60 auf Aluminiumträger mit Fluoreszenz-Indikator F₂₅₄ der Firma MERCK verwendet. Die Detektion erfolgte entweder durch Fluoreszenzlöschung mit Hilfe der UV-Lampe der Firma DESAGA bei 254 nm oder durch Färben mit folgenden Lösungen:

Kaliumpermanganat - KMnO₄ (1.5 g), K₂CO₃ (10 g), NaOH (0.2g) auf 200 mL H₂O
Vanillin – Vanillin (15 g), Konz. H₂SO₄ (2.5 mL) auf 250 mL Ethanol
Ninhydrin – Ninhydrin (1.5 g), Essigsäure (3 mL) auf 100 mL *n*-Butanol
Dinitrophenylhydrazin - 2,4-DNPH (12 g), Konz. H₂SO₄ (60 mL), H₂O (80 mL) auf 200 mL Ethanol

NMR-Spektroskopie

¹H- und ¹³C-NMR Spektren wurden auf den Geräten AVANCE 300, AVANCE 500 und DRX 500 der Firma BRUKER aufgenommen. Zusätzlich wurden für Peptide und andere Moleküle, bei denen eine eindeutige Zuordnung der Signale im eindimensionalen Spektrum nicht möglich war, zweidimensionale Spektren (TOCSY, ROESY, HMQC und HSQC) auf dem Gerät AVANCE 600 aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und auf das Restprotonensignal des jeweiligen deuterierten Lösemittels referenziert.^{[145][146]} Die Kopplungskonstanten J werden in Hertz [Hz] angegeben. Zur Auswertung der eindimensionalen Spektren wurde MESTRENOVA von der Firma MESTRELAB und zur Auswertung der zweidimensionalen Spektren CCPNMR *Open Source* verwendet.

Massenspektrometrie

Massenspektren wurden mit einem ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer vom Typ ESQUIRE 3000 oder mit einem MALDI-ToF-MS Gerät vom Typ ULTRAFLEX TREM der Firma BRUKER DALTONIC aufgenommen. Die Proben wurden für die Ionisierung mittels ESI in Methanol oder Acetonitril gelöst. Für die Ionisierung durch MALDI erfolgte eine Kokristallisation mit 2,4-Dihydroxybenzoesäure,^[147] α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure^[148] oder 2,4-Dinitrophenylhydrazin.^[149]

Die Experimente zur Massenfeinbestimmung wurden mit einem FT-ICR-Massenspektrometer des Typs APEX III mit externer ESI-Ionenquelle der Firma BRUKER DALTONIC oder mit einer ORBITRAP LTQ XL der Firma THERMO SCIENTIFIC durchgeführt.

Analytische RP-HPLC

Für die analytische Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) wurde die Anlage Accela der Firma THERMO SCIENTIFIC verwendet. Das System besteht aus dem PDA Detektor, dem ACCELA AUTOSAMPLER und der ACCELA 600 PUMPE. Die Anlage ist mit der Säule HYPERSIL GOLD, 3 μ M, 150 x 2.1 mm von THERMO SCIENTIFIC ausgestattet. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Eluent A (H₂O/ACN/TFA, 95:5:0.1) und Eluent B (H₂O/ACN/TFA, 5:95:0.1) eingesetzt. Die Flußrate beträgt 0.7 mL/min und es wurden folgende Gradienten verwendet:

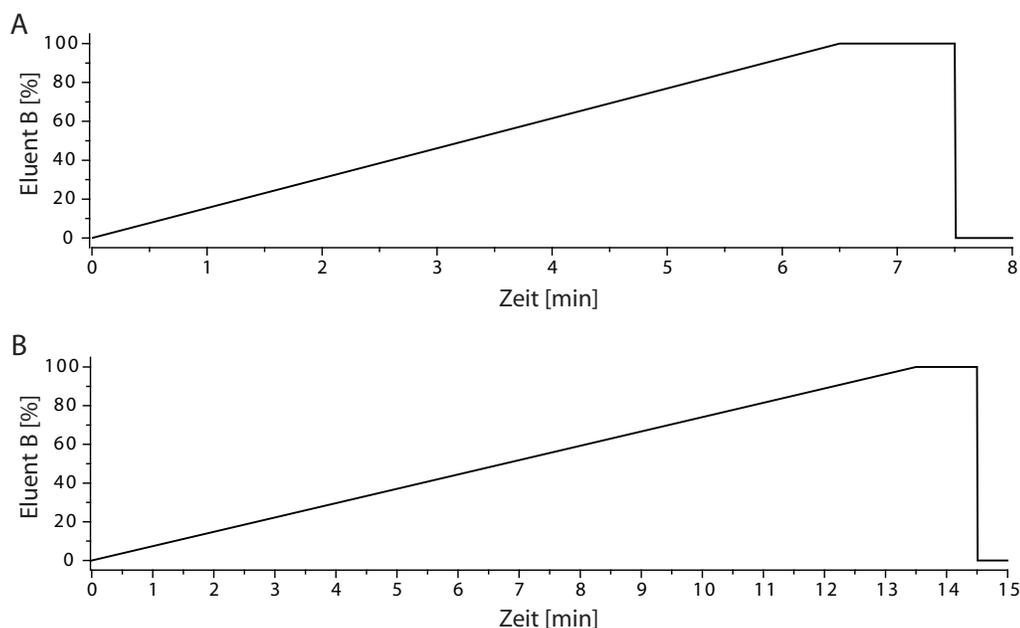


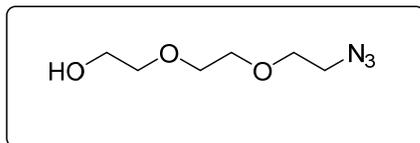
Abbildung 5-1 Gradient für die RP-HPLC: Gezeigt ist die Konzentration an Eluent B (H₂O/ACN/TFA, 5:95:0.1) in Prozent.

Präparative RP-HPLC

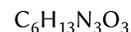
Für die präparative Umkehrphasen-HPLC wurde die Anlage LACHROM der Firma MERCK HITACHI bestehend aus dem Interface D-7000, dem UV-Vis Detektor L-7420 und der Pumpe L-7150 verwendet. Als stationäre Phase wurde die Säule JUPITER (10 μ M, C18, 300 Å, 250 x 21.2 mm) der Firma PHENOMENEX mit einer Flussrate von 10 mL/min oder die Säule NUCLEOSIL (7 μ M, C18, 100 Å, 250 x 4.6 mm) der Firma MACHERY NAGEL mit einer Flussrate von 4 mL/min eingesetzt. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Eluent A (H₂O/ACN/TFA, 95:5:0.1) und Eluent B (H₂O/ACN/TFA, 5:95:0.1) verwendet. Die Gradienten hatten eine Steigung von 1% B pro Minute und wurden für die jeweilige Verbindung individuell eingesetzt. z. B. 0-50% Eluent B in 50 Minuten.

5.1.2 Synthese der Polyethylenglycol-Linker

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (2)^[150]



$$M = 175.19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



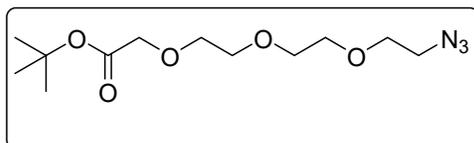
2-(2-(2-Chlorethoxy)ethoxy)ethanol (1) (3.0 g, 17.79 mmol) wird mit Natriumazid (3.4 g, 53.37 mmol) in dH₂O (15 mL) gelöst und für 3 Tage bei 80 °C gerührt. Die wässrige Phase wird mit DCM (5 x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 2.80 g (16.03 mmol, 90 %), farbloses Öl

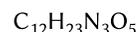
DC: R_f = 0.25 (EtOAc/PE, 1:1 v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.73 (t, 2H, ³J = 5.1 Hz, CH₂OH), 3.69-3.64 (m, 6H, (CH₂-O-CH₂-CH₂-O)), 3.60 (t, 2H, ³J = 4.9 Hz, CH₂-CH₂-N₃), 3.39 (t, ³J = 4.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-N₃).

tert-Butyl-2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)acetat (3)^[151]



$$M = 289.33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

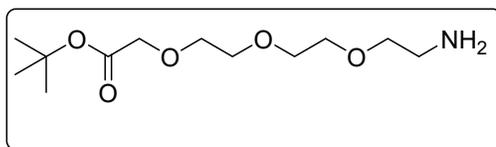


Das Azid 2 (2.0 g, 11.42 mmol) wird in abs. *tert*-Butanol (60 mL) vorgelegt und schrittweise mit Kalium-*tert*-butanolat (2.56 g, 22.89 mmol) versetzt. Dann wird *tert*-Butylbromacetat (2.54 mL, 17.21 mmol) hinzugegeben und der Ansatz 2 h bei RT gerührt. Nach einer Reaktionskontrolle mittels TLC (EtOAc/PE 1:3 v/v) wird erneut Kalium-*tert*-butanolat (0.45 g, 4.02 mmol) und *tert*-Butylbromacetat (1.0 mL, 6.78 mmol) hinzugegeben und der Ansatz weitere 45 min gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit Celite versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE 1:3 v/v) wird der PEG-Linker 3 als farbloses Öl erhalten.

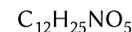
Ausbeute: 2.0 g (6.93 mmol, 61 %), farbloses Öl

DC: R_f = 0.24 (EtOAc/PE, 1:3 v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.02 (s, 2H, CH₂-CO₂), 3.79-3.61 (m, 10H, (CH₂-O)₂-CH₂), 3.39 (t, ³J = 4.9 Hz, 2H, CH₂-N₃), 1.47 (s, 9H, (CH₃)₃).

tert-Butyl-2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)acetat (4)^[152]

$$M = 263.33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

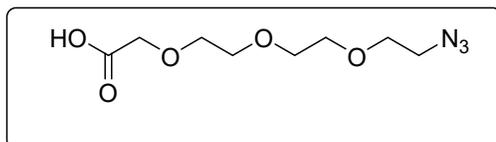


Das Azid **3** (2.00 g, 6.93 mmol) wird in Methanol (20 mL) gelöst und anschließend unter Argonatmosphäre im Ultraschallbad für 10 min entgast. Dann wird zu der Reaktionslösung Pd/C gegeben und H₂ zugeführt. Die Reaktion wird für 24 h gerührt und abschließend durch Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent DCM/MeOH/TEA 7:3:0.2 v/v/v) aufgereinigt. Trocknen im Vakuum liefert das Amin **4** als farbloses Öl.

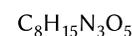
Ausbeute: 0.84 g (3.17 mmol, 46 %), farbloses Öl.

DC: R_f = 0.24 (DCM/MeOH/TEA 7:3:0.2 v/v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.02 (s, 2H, CH₂-CO₂), 3.77-3.61 (m, 8H, (CH₂O)₂), 3.51 (t, ³J = 5.3 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 2.86 (t, ³J = 5.3 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 1.47 (s, 9H, (CH₃)₃).

2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)essigsäure (5)^[151]

$$M = 233.22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



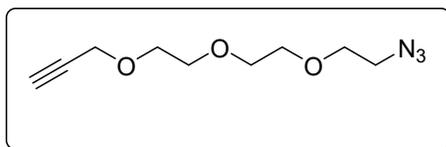
Der Ester **3** (0.65 g, 2.24 mmol) wird in DCM (15 mL) gelöst, anschließend mit TFA (15 mL) versetzt und 3 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand in dH₂O (10 mL) aufgenommen, mittels NaOH (1 M in dH₂O) auf einen pH-Wert von 11 eingestellt und mit DCM (2 x) gewaschen. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird im Anschluss mit HCl-Lösung (1 M) auf 2 eingestellt und die wässrige Phase mit EtOAc (10 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Trocknen im Hochvakuum liefert das Azid **5** als leicht gelbliches Öl.

Ausbeute: 0.49 g (2.11 mmol, 94 %), leicht gelbliches Öl.

DC: R_f = 0.73 (DCM/MeOH/Essigsäure 4:1:0.1 v/v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.18 (s, 2H, CH₂-CO₂), 3.80-3.63 (m, 10H, (CH₂O)₂-CH₂), 3.41 (t, ³J = 4.7 Hz, 2H, CH₂-N₃).

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in (6)^[153]



$$M = 213.24 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Unter Argonatmosphäre wird Natriumhydrid (60 % in Paraffinöl, 403 mg, 10.02 mmol) mit Hexan gewaschen (3 x 5 mL) und anschließend in destilliertes DMF (20 mL) überführt. Der Alkohol **2** (602 mg, 3.51 mmol) wird zur Suspension gegeben und nach 5 min Rühren wird Propargylbromid (1 mL, 13.02 mmol) im Zeitraum von 10 min zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT wird restliches NaH mit dH₂O inaktiviert und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (20 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE, 3:7 v/v) wird das Alkin **6** als gelbes Öl erhalten.

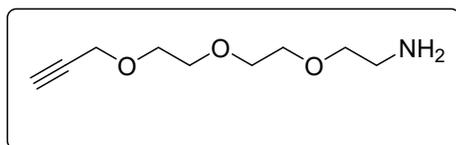
Ausbeute: 0.41 g (1.91 mmol, 55 %), gelbliches Öl.

DC: R_f = 0.45 (EtOAc/PE, 3:7 v/v).

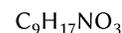
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.19 (m, 2H, CH₂-C≡CH), 3.72-7.65 (m, 10H, (CH₂O)₂-CH₂), 3.39 (t, ³J = 5.1 Hz, 2H, CH₂-N₃), 2.42 (t, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, CH₂-C≡CH).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 79.77 (CH₂-C≡CH), 74.64 (CH₂-C≡CH), 70.83 ((CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 70.81 ((CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 70.64 ((CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 70.18 ((CH₂O)₂-CH₂), 69.25 ((CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 58.54 (CH₂-C≡CH), 50.82 (CH₂-N₃).

2-(2-(2-(Prop-2-in-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethanamin (7)^[152]



$$M = 187.24 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Das Azid **6** (0.41 g, 1.91 mmol) wird in abs. THF (20 mL) gelöst und mit Triphenylphosphin (989 mg, 3.78 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei RT gerührt. Anschließend wird dH₂O (2 mL) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Das Rohprodukt wird vom Lösungsmittel befreit und nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (15 cm Kieselgel, Eluent DCM/MeOH/TEA 8:2:0.1 v/v/v) wird das Amin **7** als gelbliches Öl erhalten.

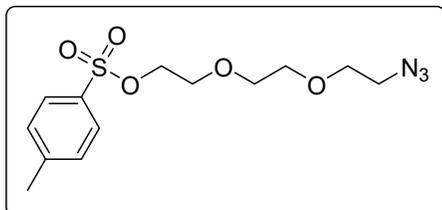
Ausbeute: 307 mg (1.64 mmol, 86 %), gelbliches Öl.

DC: R_f = 0.5 DCM/MeOH/TEA 8:2:0.1 v/v/v).

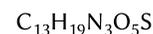
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.19 (d, ⁴J = 2.3 Hz, 2H, CH₂-C≡CH), 3.71-7.60 (m, 8H, (CH₂O)₂), 3.50 (t, ³J = 5.5 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 2.86 (t, ³J = 5.5 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 2.42 (t, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, CH₂-C≡CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 79.73 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 74.66 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 73.42 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 70.71 ($(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_2$), 70.53 ($(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_2$), 70.37 ($(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_2$), 69.22 ($(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_2$), 58.53 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 41.84 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)-4-methylbenzensulfonat (**8**)^[154]



$$M = 329.37 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



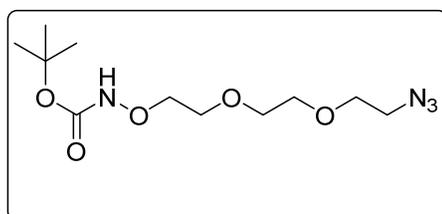
Das Azid **2** (600 mg, 3.51 mmol) wird mit Triethylamin (371 μL , 7.01 mmol) und $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ (155 mg, 1.62 mmol) in abs. DCM vorgelegt. Unter Eisbadkühlung wird *p*-Toluolsulfonylchlorid (997 mg, 5.25 mmol), gelöst in abs. DCM (1 mL), im Zeitraum von 30 min zugetropft. Der Ansatz wird 3 Tage bei RT gerührt. Das Rohprodukt wird vom Lösungsmittel befreit und nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (15 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE, 1:2 v/v) wird das Tosylat **8** als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 735 mg (2.23 mmol, 65 %), farbloses Öl.

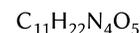
DC: $R_f = 0.5$ EtOAc/PE, 1:2 v/v).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.80 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H, C°H), 7.34 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H, C^mH), 4.16 (t, $^3J = 4.7$ Hz, 2H, $\text{SO}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.70 (t, $^3J = 4.7$ Hz, 2H, $\text{SO}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.64 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 3.60 (s, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.36 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 2.44 (s, 3H, CH_3).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)hydroxylamin (**9**)



$$M = 290.32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Das Tosylat **8** (735 mg, 2.23 mmol) wird in abs. DCM (10 mL) vorgelegt. Nach Abkühlen der Reaktion auf 4 °C werden 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (671 μL , 4.50 mmol) und *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)hydroxylamin (600 mg, 4.50 mmol), gelöst in abs. DCM (10 mL), zugetropft. Die Reaktion wird über Nacht bei RT gerührt. Das Rohprodukt wird vom Lösungsmittel befreit und nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (30 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE, 1:3 v/v) wird das Azid **9** als farbloses Öl erhalten.

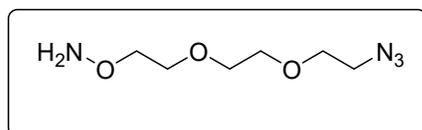
Ausbeute: 482 mg (1.66 mmol, 75 %), farbloses Öl.

DC: $R_f = 0.35$ EtOAc/PE, 1:3 v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.50 (s, 1H, NH), 4.02 (m, 2H, NH-O-CH₂-CH₂), 3.72 (m, 2H, NH-O-CH₂-CH₂), 3.70-3.65 (m, 6H, (CH₂O)₂-CH₂), 3.40 (t, ³J = 5.0 Hz, 2H, CH₂-N₃), 1.47 (s, 9H, (CH₃)₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 156.88 (-NH-C=O), 81.78 (C-(CH₃)₃), 75.52 (CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 70.77 (CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 70.75 (CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 70.79 (CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 69.50 (CH₂-CH₂-O)₂-CH₂), 50.80 (CH₂-N₃), 28.36 (C-(CH₃)₃).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)-hydroxylamin (10)



M = 190.20 g · mol⁻¹

C₆H₁₄N₄O₃

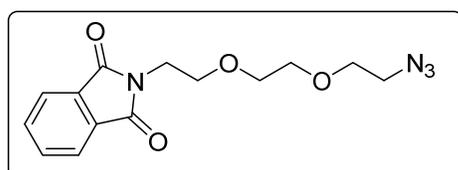
Das Azid **9** (482 mg, 1.66 mmol) wird in dH₂O/TFA (1:1 v/v, 3 mL) für 1.5 h bei RT gerührt. Abschließend wird der Reaktionsansatz mittels RP-HPLC (0-50% Eluent B) aufgereinigt. Trocknen im Hochvakuum liefert das Hydroxylamin **10** als farbloses Öl.

Ausbeute: 274 mg (1.44 mmol, 87 %), farbloses Öl.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.24 (t, ³J = 3.7 Hz, 2H, H₂N-O-CH₂-CH₂), 3.84 (t, ³J = 3.7 Hz, 2H, H₂N-O-CH₂-CH₂), 3.76-3.68 (m, 6H, (CH₂O)₂-CH₂), 3.50 (t, ³J = 5.2 Hz, 2H, CH₂-N₃).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ [ppm] = 73.82 (H₂N-O-CH₂), 69.74 (CH₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂), 69.32 (CH₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂), 69.17 (CH₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂), 68.31 (CH₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂), 50.07 (CH₂-N₃).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)-phthalimid (11)^[155]



M = 304.31 g · mol⁻¹

C₁₄H₁₆N₄O₄

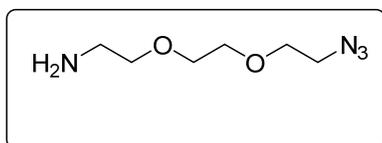
Das Tosylat **8** (2.1g, 6.37 mmol), Kaliumphthalimid (1.42 g, 7.65 mmol) und K₂CO₃ (163 mg, 1.18 mmol) werden in destilliertem DMF (20 mL) vorgelegt. Der Ansatz wird 60 h bei 70 °C gerührt. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum zur Trockne eingengt. Nach Zugabe von dH₂O (35 mL) und DCM (25 mL) wird die entstandene wässrige Phase mit DCM (5 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Phthalimid **11** wird als gelbes Öl isoliert.

Ausbeute: 1.92 g (6.31 mmol, 99 %), gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.85-7.81 (m, 2H, $\text{C}^{\text{Ph}}\text{H}$), 7.71-7.68 (m, 2H, $\text{C}^{\text{Ph}}\text{H}$), 3.89 (t, $^3\text{J} = 5.7$ Hz, 2H, (N- CH_2 - CH_2), 3.73 (t, $^3\text{J} = 5.7$ Hz, 2H, (N- CH_2 - CH_2), 3.68-3.72 (m, 6H, $(\text{CH}_2\text{O})_2$ - CH_2), 3.29 (t, $^3\text{J} = 4.9$ Hz, 2H, CH_2 - N_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 168.11 ($\text{C}=\text{O}$), 134.05 (C^{Ph}), 132.34 (C^{Ph}), 123.22 (C^{Ph}), 70.47 (CH_2 -O-(CH_2) $_2$ -O- CH_2), 70.02 (CH_2 -O-(CH_2) $_2$ -O- CH_2), 69.87 (CH_2 -O-(CH_2) $_2$ -O- CH_2), 67.86 (CH_2 -O-(CH_2) $_2$ -O- CH_2), 50.47 (CH_2 - N_3), 37.13 (N- CH_2).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)-ethylamin (**12**)^[155]



$$M = 174.20 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$$

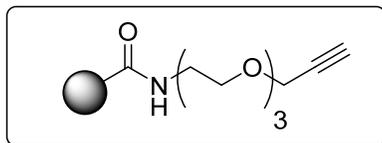
Das Phthalimid **11** (1.9 g, 6.3 mmol) wird in einer NaOH-Lösung (5 mL, 4 M in dH_2O) für 4 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wird die wässrige Phase mit DCM (10 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO_4 getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Amin **12** wird als gelbes Öl isoliert.

Ausbeute: 141 mg (0.81 mmol, 13 %), gelbes Öl.

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 175.02$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (berechnet für [$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$]⁺: 175.12) $m/z = 196.99$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (berechnet für [$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$]⁺: 197.10)

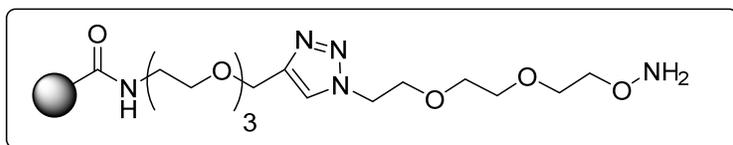
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.70-3.60 (m 10H, $(\text{CH}_2$ - $(\text{CH}_2\text{O})_2$ - CH_2), 3.52 (t, $^3\text{J} = 5.2$ Hz, 2H, $(\text{NH}_2$ - CH_2 - CH_2), 3.40 (m, 2H, CH_2 - N_3).

Sepharose-Alkin-Beads (**13a**) (**13b**)



NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (1 mL) wird in einem 15 mL-Zentrifugengefäß vorgelegt und drei mal mit PBS-Puffer (pH 7.5) gewaschen. Die Sepharose wird hierbei durch Zentrifugation (500 x g) vom Überstand getrennt. Dann wird Alkin **7** (50 mM, 1 mL PBS) hinzugegeben und der Ansatz bei 400 rpm für 4 Stunden geschüttelt. Nach waschen der Sepharose mit PBS-Puffer (pH 7.5) wird der Ansatz zweigeteilt. Die übrigen freien Aktivester werden bei den Sepharose-Alkin-Beads **13a** mit Ethylamin (0.5 M in PBS) und bei den Sepharose-Alkin-Beads **13b** mit Ethanolamin abgesättigt.

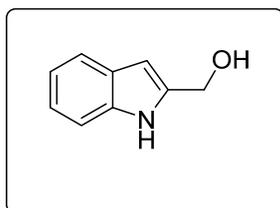
Sepharose-Hydroxylamin-Beads (14a) (14b)



Die Sepharose-Alkin-Beads **13a** oder **13b** werden in einem 15 mL-Zentrifugengefäß vorgelegt und mit H₂O/*tert*-Butanol drei mal gewaschen. Dann wird Hydroxylamin **10** (40 mM in 1 mL H₂O/*tert*-Butanol) hinzugegeben. Es erfolgt die Zugabe von CuSO₄ (2 mM) und Natriumascorbat (2 mM). Der Ansatz wird für zwei Stunden bei 400 rpm geschüttelt und abschließend werden die Sepharose-Hydroxylamin-Beads **14a** oder **14b** mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in EtOH/H₂O gelagert.

5.1.3 Synthese der Affinitätsgruppe für die HIPS-Ligation

2-(Hydroxymethyl)indol (**16**)^[156]



$$M = 147.18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_9\text{H}_9\text{NO}$$

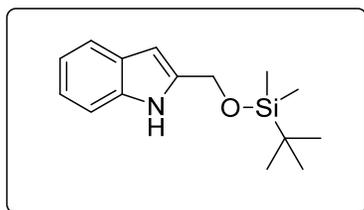
In einem 250 mL-Schlenkkolben wird Ethyl-indol-2-carboxylat (**15**) (3.5 g, 18.5 mmol) vorgelegt und in abs. THF (40 mL) gelöst. Unter Eisbadkühlung erfolgt die Zugabe von LiAlH₄ (1.4 g, 37.0 mmol). Das Gemisch wird 20 min bei 0 °C und anschließend 2 h bei RT gerührt. Überschüssiges LiAlH₄ wird durch Zugabe von Methanol neutralisiert und die entstandene Suspension filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockne eingedunstet. Nach Zugabe von dH₂O (40 mL) und DCM (40 mL) wird die entstandene wässrige Phase mit DCM (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (10 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE, 1:1.5 v/v) wird 2-(Hydroxymethyl)indol (**16**) als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.20 g (15.17 mmol, 82 %), roter Feststoff

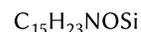
DC: R_f = 0.2 (EtOAc/PE, 1:1.5 v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.37 (bs, 1H, NH), 7.59 (m, 1H, C⁴H), 7.33 (m, 1H, C⁷H), 7.19 (m, 1H, C⁵H), 7.11 (m, 1H, C⁶H), 6.40 (s, 1H, C²H), 4.81 (s, 2H, CH₂-OH).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 137.68 (C^{7a}), 136.46 (C²), 128.26 (C^{3a}), 122.33 (C⁶), 120.77 (C⁵), 120.09 (C⁴), 111.05 (C⁷), 100.66 (C³), 58.97 (CH₂-OH).

2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)-indol (17)^[12]

$$M = 261.44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



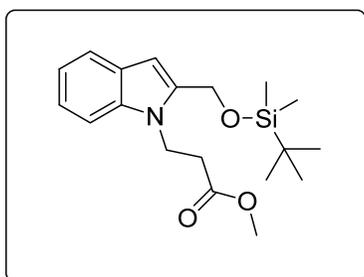
In einem 100 mL-Schlenkkolben werden 2-(Hydroxymethyl)indol (**16**) (1.90 g, 12.91 mmol) und Imidazol (2.64 g, 38.73 mmol) in abs. DCM (30 mL) gelöst. Zu der entstandenen Lösung wird *tert*-Butyldimethylsilyl-chlorid (2.92 g, 19.37 mmol) gegeben und abschließend über Nacht bei RT gerührt. Die gebildete Suspension wird zu einem orangenen Feststoff im Vakuum eingengt. Nach Zugabe von Et₂O (50 mL) wird die organische Phase mit 5 %iger Essigsäurelösung (3 x 20 mL) gewaschen. Abschließend wird die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Trocknen im Hochvakuum liefert 2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)-indol (**17**) als roten Feststoff.

Ausbeute: 3.33 g (12.73 mmol, 99 %), roter Feststoff

DC: R_f = 0.5 (EtOAc/PE, 1:19 v/v).

¹H-NMR (500 MHz, C₆D₅CD₃): δ [ppm] = 7.57 (m, 1H, C⁴H), 7.48 (bs, 1H, NH), 7.14 (m, 1H, C⁷H), 7.12 (m, 1H, C⁵H), 7.01 (m, 1H, C⁶H), 6.25 (s, 1H, C³H), 4.55 (s, 2H, CH₂-O), 0.91 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0.01 (s, 6H, Si-(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, C₆D₅CD₃): δ [ppm] = 129.56 (C^{7a}), 128.63 (C²), 125.80 (C^{3a}), 122.39 (C⁶), 221.25 (C⁴), 120.51 (C⁵), 111.46 (C⁷), 100.32 (C³), 59.81 (CH₂-O), 26.42 (Si-C(CH₃)₃), 18.92 (Si-C(CH₃)₃), 4.88 (Si-(CH₃)₂).

Methyl 3-(2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)-indol-1-yl)propanoat (**18**)^[12]

$$M = 347.53 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



In einem 100 mL-Einhalsskolben wird 2-(((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-indol (**17**) (3.33 g, 12.73 mmol), gelöst in Methylacrylat (7.5 mL) und Acetonitril (30 mL) vorgelegt. Unter Rühren erfolgt die Zugabe 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (1.93 mL, 12.91 mmol). Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 100 °C zum Rückfluss erhitzt und anschließend im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE, 1:12 v/v) wird 3-(2-(((*tert*-

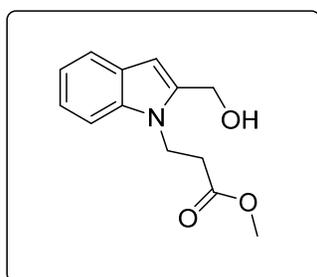
Butyldimethylsilyloxy)methyl)-indol-1-yl)propanoat (**18**) als gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.25 g (9.34 mmol, 73 %), gelblicher Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 7.52 (m, 1H, C⁴H), 7.39 (m, 1H, C⁷H), 7.17 (m, 1H, C⁵H), 7.05 (m, 1H, C⁶H), 6.39 (s, 1H, C³H), 4.87 (s, 2H, CH₂-O), 4.49 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂), 3.62 (s, 3H, O-CH₃), 2.91 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂), 0.93 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0.12 (s, 6H, Si-(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 172.60 (C=O), 139.75 (C²), 137.88 (C^{7a}), 128.50 (C^{3a}), 122.53 (C⁶), 121.47 (C⁴), 120.39 (C⁵), 110.40 (C⁷), 102.21 (C³), 58.57 (CH₂-O), 52.17 (CH₃), 40.07 (N-CH₂-CH₂), 35.04 (N-CH₂-CH₂), 26.13 (Si-C(CH₃)₃), 18.79 (Si-C(CH₃)₃), -5.22 (Si-(CH₃)₂).

Methyl 3-(2-(Hydroxymethyl)-indol-1-yl)propanoat (19**)**^[12]



M = 233.27 g · mol⁻¹ C₁₃H₁₅NO₃

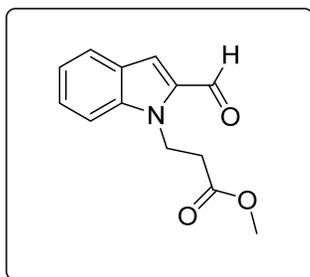
In einem 50 mL-Einhalskolben wird Indol **18** (3.25 g, 9.34 mmol) vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und langsam in einer Tetramethylammoniumfluorid-Lösung (1 M in THF, 30 mL) gelöst. Nach 1 h Rühren bei RT wird die Lösung in Diethylether (100 mL) aufgenommen, mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (3 x 30 mL) gewaschen und zu einem schwach grünen Öl eingengt. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (20 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE, 1:2 v/v) wird Methyl 3-(2-(hydroxymethyl)-indol-1-yl)propanoat (**19**) als grüngelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.94 g (8.31 mmol, 89 %), grüngelblicher Feststoff

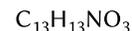
DC: R_f = 0.39 (EtOAc/PE, 1:2 v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.59 (m, 1H, C⁴H), 7.34 (m, 1H, C⁷H), 7.24 (m, 1H, C⁵H), 7.12 (m, 1H, C⁶H), 6.47 (s, 1H, C³H), 4.83 (s, 2H, CH₂-OH), 4.56 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂), 3.67 (s, 3H, O-CH₃), 2.91 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.99 (C=O), 138.31 (C^{7a}), 136.88 (C²), 127.44 (C^{3a}), 122.12 (C⁶), 120.96 (C⁴), 119.76 (C⁵), 109.20 (C⁷), 102.28 (C³), 57.16 (CH₂-OH), 51.88 (CH₃), 39.03 (N-CH₂-CH₂), 34.20 (N-CH₂-CH₂).

Methyl 3-(2-Formyl-indol-1-yl)propanoat (20)

$$M = 231.25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



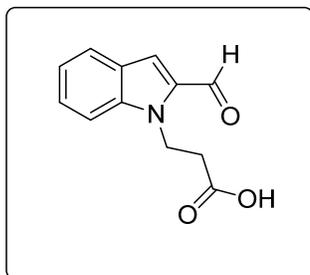
In einem 50 mL-Einhalskolben wird Indol **19** (1.94 g, 8.31 mmol), gelöst in DCM (36 mL), vorgelegt und unter Rühren mit Mangan(IV)-oxid (4.05 g, 46.6 mmol) versetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei RT gerührt. Abschließend wird die Reaktion über Flash-Chromatographie (5 cm Kieselgel, Eluent DCM) gefiltert. Trocknen im Hochvakuum liefert Methyl 3-(2-Formyl-indol-1-yl)propanoat (**20**) als leicht grünen Feststoff.

Ausbeute: 1.79 g (7.72 mmol, 93 %), leicht grüner Feststoff

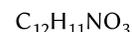
DC: $R_f = 0.7$ (EtOAc/PE, 1:3 v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.87 (s, 1H, CH=O), 7.73 (m, 1H, C⁴H), 7.51 (m, 1H, C⁷H), 7.43 (m, 1H, C⁵H), 7.29 (m, 1H, C⁶H), 7.18 (m, 1H, C³H), 4.84 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂), 3.62 (s, 3H, CH₃), 2.84 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 182.50 (CH=O), 171.83 (C=O), 140.20 (C^{7a}), 135.17 (C²), 127.28 (C^{3a}), 126.47 (C⁶), 123.54 (C⁴), 121.26 (C⁵), 118.63 (C³), 110.71 (C⁷), 51.91 (CH₃), 40.64 (N-CH₂-CH₂), 35.05 (N-CH₂-CH₂).

3-(2-Formyl-indol-1-yl)propansäure (21)^[12]

$$M = 217.22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



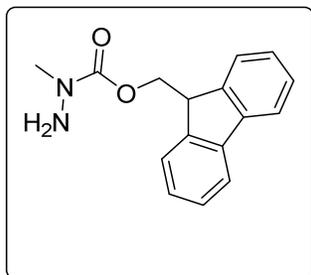
In einem 50 mL-Einhalskolben wird Methyl 3-(2-Formyl-indol-1-yl)propanoat (**20**) (1.07 g, 4.63 mmol) in Dioxan (20 mL) vorgelegt und mit einer wässrigen LiOH-Lösung (4 M, 2 mL) versetzt. Die Reaktion wird über Nacht bei RT gerührt. Im Verlauf der Reaktion fällt ein farbloser Feststoff aus. Der Reaktionsansatz wird mit HCl (1 M) auf einen pH-Wert von 4 eingestellt. Hierbei löst sich der Feststoff. Nach Zugabe von EtOAc (80 mL) wird die organische Phase mit dH₂O (2 x 20 mL, pH 4) und ges. NaCl-Lösung (1 x 20 mL, pH 4) gewaschen. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE/Essigsäure, 1:2:0.01 v/v/v) wird 3-(2-Formyl-indol-1-yl)propansäure (**21**) als rosafarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.86 g (3.96 mmol, 85 %), rosafarbener Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.82 (s, 1H, CH=O) 7.69 (m, 1H, C⁴H), 7.45 (m, 1H, C⁷H), 7.39 (m, 1H, C⁵H), 7.21 (s, 1H, C³H), 7.15 (m, 1H, C⁶H), 4.84 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂), 2.84 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, N-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 182.55 (CH=O), 176.73 (C=O), 140.18 (C^{7a}), 135.11 (C²), 127.29 (C^{3a}), 126.47 (C⁶), 123.56 (C⁴), 121.25 (C⁵), 118.67 (C³), 110.61 (C⁷), 40.21 (N-CH₂-CH₂), 34.86 (N-CH₂-CH₂).

Hydrazincarbonsäure-(9H-Fluoren-9-yl)-1-methylester (22)^[157]



M = 268.32 g · mol⁻¹

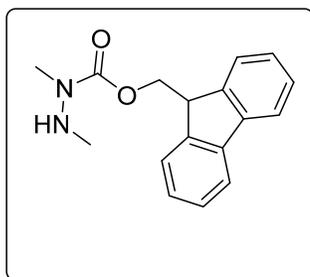
C₁₆H₁₆N₂O₂

In einem 250 mL-Einhalskolben wird Methylhydrazin (2.0 g, 43.40 mmol) in DCM (60 mL) gelöst und mit Trimethylamin (8.0 mL, 90.67 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wird auf -78 °C gekühlt, dann erfolgt die Zugabe von 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (5.0 g, 19.33 mmol), gelöst in DCM (20 mL), innerhalb von 1.5 h. Die entstandene Suspension wird im Anschluss 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die organische Phase mit dH₂O (3 x 30 mL) und ges. NaCl-Lösung (1 x 30 mL) gewaschen und abschließend über MgSO₄ getrocknet. Trocknen im Vakuum liefert Hydrazincarbonsäure-(9H-Fluoren-9-yl)-1-methylester (22) als farbloser Feststoff, welcher ohne weitere Aufarbeitung für die nächste Stufe eingesetzt wird.

Ausbeute: 4.7 g (17.50 mmol, 83 %), farbloser Feststoff

DC: R_f = 0.5 (EtOAc/PE, 1:1 v/v).

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): *m/z* = 291.10 [M+Na]⁺ (berechnet für [C₁₆H₁₆N₂O₂+Na]⁺: 291.11)

Hydrazincarbonsäure-(9H-Fluoren-9-yl)-1,2-dimethylester (23)^[157]

$$M = 282.34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



In einem 100 mL-Einhalskolben wird Rohprodukt **22** (4.7 g, 17.50 mmol) in Ethanol (50 mL) vorgelegt. Es erfolgt die Zugabe von Formaldehyd (37 % in H₂O, 1.4 mL, 17.23 mmol) sowie Essigsäure (50 µL, 0.87 mmol). Die Lösung wird 2 h bei 80 °C zum Rückfluss erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in Methanol (50 mL) gelöst und es wird NaBH₃CN (1.20 g, 19.10 mmol) hinzugegeben. Der pH-Wert der Reaktion wird mit HCl (1 M) auf ca. 3 eingestellt und der Ansatz über Nacht gerührt. Der pH-Wert wird mit HCl (1 M) auf ca. 1 gesenkt und die Reaktion wird weitere 30 min bei RT gerührt. Danach wird die Lösung mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert, anschließend filtriert und im Vakuum eingengt. Nach Zugabe von EtOAc (50 mL) wird die entstandene organische Phase mit dH₂O (3 x 20 mL) und ges. NaCl-Lösung (1 x 20 mL) gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (30 cm Kieselgel, Eluent EtOAc/PE, 1:3 v/v) wird das Produkt **23** als farbloser Feststoff erhalten.

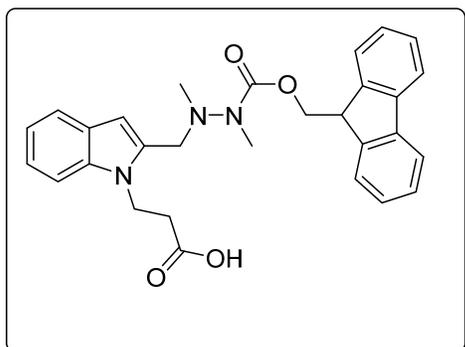
Ausbeute: 1.14 g (4.02 mmol, 23 %), farbloser Feststoff

DC: R_f = 0.3 (EtOAc/PE, 1:3 v/v).

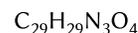
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.77 (d, ³J = 10 Hz, 2H, H^{Fmoc}), 7.59 (d, ³J = 10 Hz, 2H, H^{Fmoc}), 7.41 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H^{Fmoc}), 7.32 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H^{Fmoc}), 4.47 (bs, 2H, CH-CH₂), 4.26 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, (CH-CH₂)), 3.06 (s, 3H, HN-CH₃), 2.57 (bs, 3H, Fmoc-N-CH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 156.62 (C=O), 144.00 (C^{Fmoc}), 141.48 (C^{Fmoc}), 127.86 (C^{Fmoc}), 127.20 (C^{Fmoc}), 125.02 (C^{Fmoc}), 120.12 (C^{Fmoc}), 67.69 (CH-CH₂), 47.43 (CH-CH₂), 36.45 (Fmoc-N-CH₃), 35.78 (HN-CH₃)

3-(2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-1,2-dimethylhydrazinyl)methyl)-indol-1-yl)propansäure (24)^[12]



$$M = 483.57 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Das Indol **21** (100 mg, 0.46 mmol) und Fmoc-Dimethylhydrazin **23** (155 mg, 0.55 mmol) werden in Dichlorethan (2.5 mL) gelöst und unter Argonatmosphäre 1 h bei RT gerührt. Dann erfolgt die Zugabe von $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (117 mg, 0.55 mmol) und der Ansatz wird erneut 1 h bei RT gerührt. Nach erneuter Zugabe von $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (112 mg, 0.53 mmol) und Rühren bei RT für 1 h wird der Ansatz im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt. Sublimationstrocknung liefert das gewünschte Produkt **24**.

Ausbeute: 127 mg (0.26 mmol, 57 %), rosafarbener Feststoff

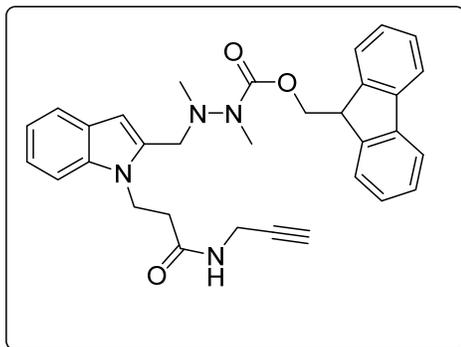
RP-HPLC (Methode A): $t_R = 6.25$ min

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 484.20$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4+\text{H}]^+$: 484.22)

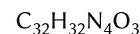
¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.77 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H^{Fmoc}), 7.64 (m, 1H, C^4H), 7.54 (m, 2H, H^{Fmoc}), 7.39 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H^{Fmoc}), 7.35 (m, 1H, C^7H), 7.30 (m, 2H, H^{Fmoc}), 7.21 (m, 1H, C^5H), 7.10 (m, 1H, C^6H), 6.06 (bs, 0.4H, C^3H), 5.90 (bs, 0.6H, C^3H), 4.57-4.31 (bm, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}$), 4.25 (bs, 1H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}$), 4.13 (bs, 1H, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_3$), 3.45 (bs, 1H, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_3$), 3.05 (bm, 2H, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_3$), 2.82 (s, 3H, N-CH_3), 2.55-2.50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_3$), 2.10 (bs, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 174.85 (COOH), 154.78 (O=C-N), 143.79 (C^{Fmoc}), 141.55 (C^{Fmoc}), 137.06 (C^2), 134.27 (C^{7a}), 127.94, 127.58, 127.27, 125.06, 122.30, 120.92, 120.16, 119.75, (4 C^{Fmoc} , C^{3a} , C^6 , C^4 , C^5) 109.35 (C^3), 104.03 (C^7), 67.33 (O- CH_2), 51.53, 47.36, 40.01, 39.80, 35.24 ($\text{CH}_3\text{-N-CH}_2$, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$, CH-CH_2 , N-CH_3 , Fmoc-N-CH_3), 32.15 (O=C- CH_2).

3-(2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-1,2-dimethylhydrazinyl)-1-methyl-indol-1-yl)-N-propargylpropanamid (25)



$$M = 520.63 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Indol **24** (30 mg, 0.062 mmol) wird in DMF (1.6 mL) vorgelegt. Anschließend werden TBTU (60 mg, 0.186 mmol), DIPEA (32 μL , 0.186 mmol) und Propargylamin (12 μL , 0.186 mmol) hinzugegeben und der Reaktionsansatz wird 1 h bei RT gerührt. Es werden erneut TBTU (60 mg, 0.186 mmol), DIPEA (32 μL , 0.186 mmol) und Propargylamin (12 μL , 0.186 mmol) hinzugegeben. Nach Rühren über Nacht wird der Reaktionsansatz mittels RP-HPLC (30-100% Eluent B) aufgereinigt. Sublimationstrocknung liefert Alkin **25**.

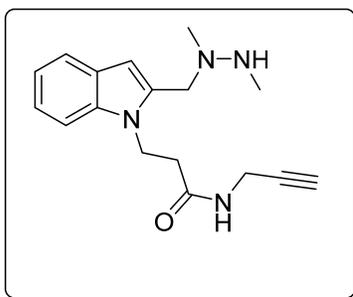
Ausbeute: 20.4 mg (0.039 mmol, 63 %), hellgelber Feststoff

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 4.58 \text{ min}$

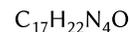
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.29 (bs, 1H, NH), 7.79 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H^{Fmoc}), 7.56 (m, 2H, H^{Fmoc}), 7.52 (d, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H, C^4H), 7.45 (d, $^3J = 8.5 \text{ Hz}$, 1H, C^7H), 7.41 (t, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H^{Fmoc}), 7.30 (m, 2H, H^{Fmoc}), 7.23 (t, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H, C^5H), 7.09 (m, 1H, C^6H), 6.38 (s, 1H, C^3H), 4.54-4.41 (m, 4H, N- CH_2 - CH_2 , O- CH_2 -CH), 4.23 (t, $^3J = 6.4 \text{ Hz}$, 1H, O- CH_2 -CH), 4.04-3.83 (m, 4H, CH_2 - $\text{C}\equiv\text{CH}$, C- CH_2 -N), 3.30 (m, 1H, CH_2 - $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.97 (s, 3H, N- CH_3), 2.81 (bm, 2H, N- CH_2 - CH_2), 2.45 (s, 3H, CH_2 -N- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.93 (COOH), 156.40 (O=C-N), 143.78 (C^{Fmoc}), 141.51 (C^{Fmoc}), 137.43 (C^2), 133.65 (C^{7a}), 128.01, 127.22, 127.16, 125.02, 122.53, 120.58, 120.23, 120.05 (4 C^{Fmoc} , C^{3a} , C^6 , C^4 , C^5), 109.73 (C^3), 103.97 (C^7), 78.90 (N- CH_2 - $\text{C}\equiv\text{CH}$), 71.73 (N- CH_2 - $\text{C}\equiv\text{CH}$), 68.02 (O- CH_2), 51.49, 47.37, 41.16, 39.44, 37.00 (CH_3 -N- CH_2 , N- CH_2 - CH_2 , CH- CH_2 , N- CH_3 , Fmoc-N- CH_3), 29.71 (O=C- CH_2), 26.63 (N- CH_2 - $\text{C}\equiv\text{CH}$).

1,2-(((Dimethylhydrazinyl)methyl)-indol-1-yl)-N-propargylpropanamid (26)



$$M = 298.39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Das Alkin **25** (20.4 mg, 0.039 mmol) wird in DMF/Piperidin (8:2 v/v) gelöst und für 30 min bei RT gerührt. Abschließend wird der Reaktionsansatz mittels RP-HPLC (30-100% Eluent B) aufgereinigt. Sublimationstrocknung liefert Alkin **26** als hellgelben Feststoff.

Ausbeute: 10.1 mg (0.034 mmol, 87 %), hellgelber Feststoff

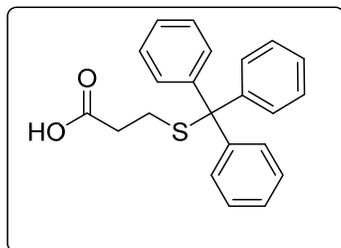
RP-HPLC (Methode A): $t_R = 2.84$ min

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.43 (bs, 1H, **NH**), 7.53 (m 1H, **C⁴H**), 7.48 (m, 1H, **C⁷H**), 7.17 (m, 1H, **C⁵H**), 7.04 (m, 1H, **C⁶H**), 6.51 (s, 1H, **C³H**), 4.44 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, **N-CH₂-CH₂**), 4.22 (m, 2H, **CH₂-C \equiv CH**), 3.83 (m, 2H, **C-CH₂-N**), 3.12 (t, $^4J = 2.1$ Hz, 1H, **CH₂-C \equiv CH**), 2.79 (s, 3H, **N-CH₃**), 2.58 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, **N-CH₂-CH₂**), 2.55 (s, 3H, **NH-CH₃**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 169.81 (**C=O**), 136.91 (**C²**), 132.54 (**C^{7a}**), 126.93 (**C^{3a}**), 121.81 (**C⁶**), 120.38 (**C⁴**), 119.48 (**C⁵**), 110.00 (**C⁷**), 103.80 (**C³**), 80.93 (**CH₂-C \equiv CH**), 73.20 (**CH₂-C \equiv CH**), 73.18 (**C-CH₂-N**), 51.20 (**N-CH₂-CH₂**), 40.11 (**NH-CH₃**), 35.40 (**N-CH₃**), 30.37 (**N-CH₂-CH₂**), 27.88 (**CH₂-C \equiv CH**).

5.1.4 Synthese der Affinitätsgruppe für die *trapped*-Knoevenagel Ligation

3-(Tritylthio)propansäure (28)



$$M = 348.46 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{S}$$

Mercaptopropionsäure (27) (2.2 g, 20.70 mmol) wird in abs. DCM (10 mL) gelöst und anschließend auf 4 °C gekühlt. Im Zeitraum von 45 min wird Tritylchlorid (5.8 g, 20.70 mmol), gelöst in abs. DCM (15 mL), zugetropft. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt. Im Laufe der Reaktion fällt ein farbloser Feststoff aus, welcher durch Filtration isoliert wird. Nach Umkristallisieren in DCM wird 3-(Tritylthio)propansäure (28) als farbloser Feststoff erhalten.

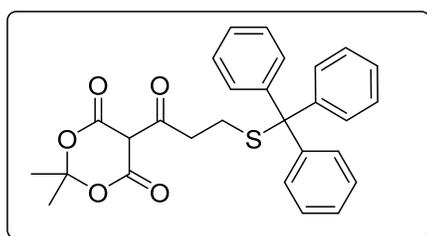
Ausbeute: 6.77 g (19.40 mmol, 94 %), farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0.45$ (EtOAc/PE, 1:2v/v).

¹H-NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 7.30 (m, 15H, TrtH), 2.28 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-S), 2.16 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-COOH).

¹³C-NMR (126 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 172.69 (-COOH), 144.35 (TrtC^{ipso}), 129.08 (TrtC^m), 128.05 (TrtC^o), 126.74 (TrtC^p), 66.16 (S-C(Ph₃)), 32.88 (CH₂-COOH), 26.68 (CH₂-S).

2,2-Methyl-5-(3-(trityl-thio)propionyl)-1,3-dioxane-4,6-dion (29)^[16]

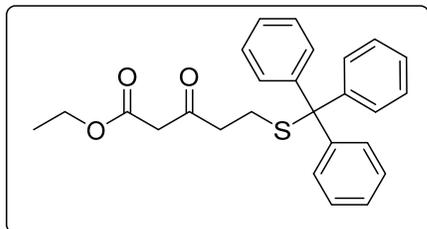


$$M = 474.57 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{S}$$

In einem 250 mL Schlenkkolben werden 3-(Tritylthio)propansäure (28) (3.51 g, 10.07 mmol), Meldrumsäure (1.74 g, 12.10 mmol) und 4-(Dimethylamino)pyridin (20.9 mg, 0.171 mmol) in abs. DCM (20 mL) auf 4 °C gekühlt. Im Zeitraum von 30 min erfolgt die Zugabe von DCC (2.71 g, 13.23 mmol) gelöst in abs. DCM (20 mL). Die entstandene Lösung wird 5 h bei RT gerührt und anschließend mit DCM (50 mL) verdünnt. Die organische Phase wird mit einer HCl-Lösung (0.5 M, 3 x 40 mL) und einer gesättigten NaCl-Lösung (3 x 40 mL) gewaschen. Abschließend wird die organische

Phase über MgSO_4 getrocknet und bei RT vom Lösungsmittel befreit. Trocknen im Hochvakuum liefert 2,2-Methyl-5-(3-(tritylthio)propionyl)-1,3-dioxane-4,6-dion (**29**) welches ohne weitere Aufarbeitung für die nächste Stufe eingesetzt wird.

Ethyl-3-oxo-5-(3-(tritylthio)pentanoat (**30**)^[16]



$$M = 418.55 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{S}$$

Der Feststoff **29** wird in abs. Ethanol (70 mL) gelöst und 16 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (30 cm Kieselgel, Eluent DCM/PE, 3:2 v/v) wird das Produkt **30** als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

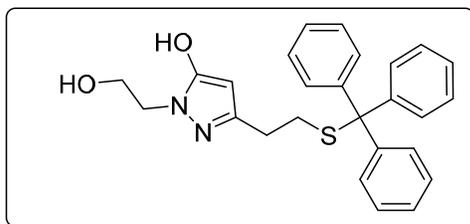
Ausbeute: 2.69 g (6.42 mmol, 64 %), leicht gelblicher Feststoff

DC: $R_f = 0.22$ (DCM/PE, 3:2 v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.30-7.15 (m, 15H, TrtH), 4.15 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.29 (s, 2H, $\text{C=OCH}_2\text{C=O}$), 2.50-2.38 (m, 4H, $\text{C=O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 1.25 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 203.93 (C=O), 166.92 (O-C=O), 144.70 (TrtC^{ipso}), 129.73 (TrtC^m), 128.04 (TrtC^o), 126.79 (TrtC^p), 66.98 (S-C(Ph₃)), 61.52 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$), 49.31 (O=C-CH₂-C=O), 34.42 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 25.60 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 14.21 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$).

1-(2-Hydroxyethyl)-3-(2-(tritylthio)ethyl)-1H-pyrazol-4-ol (**31**)



$$M = 430.57 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$$

Der β -Ketoester **30** (1.01 g, 2.39 mmol) und 2-Hydroxyethylhydrazin (200 μL , 2.95 mmol) werden in abs. Ethanol (3 mL) vorgelegt. Die entstandene Suspension wird 2 h bei 100 °C gerührt. Die nun klare Lösung wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent EtOAc) wird das Pyrazolon **31** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 844 mg (1.96 mmol, 82 %), farbloser Feststoff

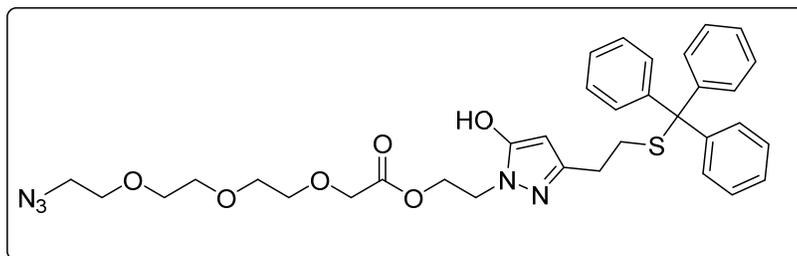
DC: $R_f = 0.2$ (EtOAc).

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 431.21$ $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{26}H_{27}N_2O_2S]^+$: 431.18)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.45-7.15 (m, 15H, TrtH), 4.48 (s, 1H, HO-C=CH-C), 4.00 (t, $^3J=5.4$ Hz, 2H, CH_2-CH_2-OH), 3.70 (t, $^3J=5.4$ Hz, 2H, CH_2-CH_2-OH), 2.49-2.39 (m, 4H, CH_2-CH_2-S).

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 157.29 (N-C-OH), 148.65 (C=N), 144.37 (TrtC^{ipso}), 129.60 (TrtC^m), 128.16 (TrtC^o), 127.09 (TrtC^p), 90.93 (HO-C=CH), 76.91 (S-C(Ph₃)), 67.44 (CH_2-CH_2-OH), 47.93 (CH_2-CH_2-OH), 29.86 (CH_2-CH_2-S), 25.88 (CH_2-CH_2-S).

2-(5-oxo-3-(2-(Tritylthio)ethyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)ethyl-2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxyacetat (32)



$M = 645.78 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
 $C_{34}H_{39}N_5O_6S$

Das Pyrazolon **31** (100 mg, 0.238 mmol) wird in abs. DCM (5 mL) mit dem PEG-Azid-Linker **5** (55 mg, 0.236 mmol) und DMAP (2 mg, 0.016 mmol) vorgelegt. Dann wird der Ansatz auf 4 °C gekühlt. Anschließend wird DCC (50 mg, 0.24 mmol), gelöst in abs. DCM (10 mL) innerhalb von 10 Minuten zugetropft und der Reaktionsansatz 4 h bei RT gerührt. Abschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt in ACN (4 mL) aufgenommen. Der Feststoff wird durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min) abgetrennt und der Reaktionsansatz mittels RP-HPLC (50-100% Eluent B) aufgereinigt. Trocknen im Hochvakuum liefert das Azid **32**.

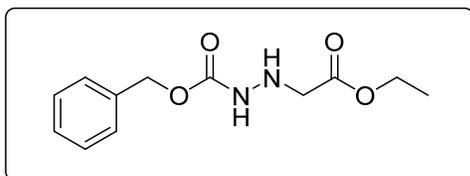
Ausbeute: 104 mg (0.16 mmol, 70 %), farbloses Öl

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 3.95$ min

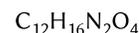
1H -NMR (500 MHz, C_2D_6OS): δ [ppm] = 7.35-7.22 (m, 15H, TrtH), 5.16 (s, 1H, HO-C=CH-C), 4.29 (t, $^3J=5.4$ Hz, 2H, N- CH_2-CH_2-O), 4.05 (t, $^3J=5.4$ Hz, 2H, N- CH_2-CH_2-O), 4.03 (s, 2H, CH_2-CO_2), 3.58 (t, $^3J = 4.9$ Hz, 2H, $CH_2-CH_2-N_3$), 3.56-3.48 (m, 8H, $(CH_2-CH_2O)_2$), 3.37 (t, $^3J = 4.9$ Hz, 2H, CH_2-N_3), 2.43-2.29 (m, 4H, CH_2-CH_2-S).

^{13}C -NMR (126 MHz, C_2D_6OS): δ [ppm] = 169.94 (C=O), 153.48 (HO-C=CH-C), 148.57 (HO-C=CH-C), 144.48 (TrtC^{ipso}), 129.11 (TrtC^m), 128.03 (TrtC^o), 126.72 (TrtC^p), 86.41 (HO-C=CH-C), 69.97, 69.74, 69.70, 69.66, 69.26 ($N_3-CH_2-CH_2-(CH_2-CH_2O)_2$), 68.21 (CH_2-CO_2), 67.52 N- CH_2-CH_2-O), 66.17 (S-C(Ph₃)), 49.99 ($N_3-CH_2-CH_2$), 44.23 (CH_2-CH_2-N), 30.88 (CH_2-CH_2-S), 27.51 (CH_2-CH_2-S).

Benzyloxycarbonylhydrazinoessigsäureethylester (35)



$$M = 252.11 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Benzyloxycarbonylhydrazinoessigsäureethylester (**35**) (4.02 g, 24.0 mmol) wird in abs. THF gelöst und mit DIPEA (8.20 mL, 48.0 mmol) versetzt. Im Anschluss wird Iodessigsäureethylester (**34**) (5.14 g, 24.0 mmol) hinzugegeben und die entstandene Lösung 3 d bei RT gerührt. Der entstandene farblose Niederschlag wird filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt **35** wird mittels Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent PE/ EtOAc = 2:1 v/v) gereinigt und das Lösungsmittel der Produkt **35** enthaltenden Fraktionen im Vakuum entfernt.

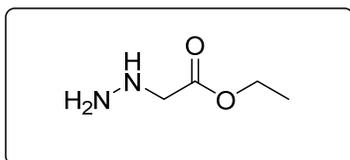
Ausbeute: 3.89 g (15.41 mmol, 64 %), farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0.2$ (EtOAc/PE, 1:2 v/v).

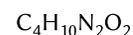
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.39-7.30 (m, 5H, PhH), 5.14 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.20 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 3.67 (s, 2H, NH-CH₂-C=O), 1.27 (t, ³J = 7.2 Hz, 3H, O-CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.25 (O=C-O-CH₂-CH₃), 156.81 (OC=ONH), 136.02 (PhC^{ipso}), 128.71 (PhC^m), 128.48 (PhC^o), 128.39 (PhC^p), 67.39 (Ph-CH₂-C=O), 61.33 (O-CH₂-CH₃), 52.86 (NH-CH₂-C=O), 14.30 (O-CH₂-CH₃).

Hydrazinoessigsäureethylester (36)



$$M = 118.14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



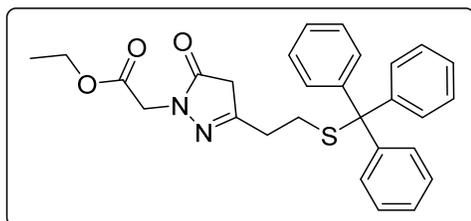
Benzyloxycarbonylhydrazinoessigsäureethylester (**35**) (3.6 g, 15.3 mmol) wird in entgastem Methanol (30 mL) gelöst und katalytische Mengen Pd/C werden zugegeben. Unter Rühren wird für 16 h bei Raumtemperatur H₂ eingeleitet. Das Rohprodukt **36** wird mittels Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent DCM:MeOH:Et₃N = 1:19:0.1 v/v/v) gereinigt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum bei maximal 50 mbar eingeeengt.

Ausbeute: 3.89 g (15.41 mmol, 72 %), farbloses viskoses Öl

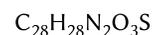
DC: $R_f = 0.3$ (MeOH/DCM/Et₃N, 1:19:0.1 v/v/v).

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 4.22 (q, ³J = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂-CH₃), 3.52 (s, 2H, NH-CH₂-C=O), 1.29 (t, ³J = 7.2 Hz, 3H, CH₂-CH₃).

Ethyl 2-(5-Oxo-3-(2-(tritylthio)ethyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)acetat (37)^[16]



$$M = 472.60 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Der β -Ketoester **30** (1.64 g, 3.92 mmol) und Hydrazinoessigsäureethylesterhydrochlorid (**37**) (788 mg, 5.1 mmol) werden in abs. Ethanol (65 mL) vorgelegt. Zu der entstandenen Suspension wird Triethylamin (820 μL , 5.88 mmol) gegeben und der Ansatz wird 2 h bei 40 °C gerührt. Die nun klare Lösung wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent DCM/THF, 9.5:0.5 v/v) wird das Pyrazolon **37** als farbloser Feststoff erhalten.

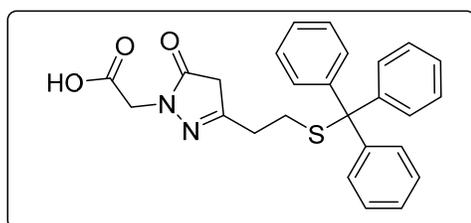
Ausbeute: 809 mg (1.71 mmol, 44 %), farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0.51$ (DCM/THF, 9.5:0.5 v/v).

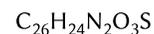
¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.45-7.19 (m, 15H, TrtH), 4.38 (s, 2H, $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 4.19 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.00 (s, 2H, $\text{O=C-CH}_2\text{-C}$), 2.51-2.39 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 1.25 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.58 (CO_2), 167.97 ($\text{O=C-CH}_2\text{-C}$), 157.64 (C=N), 144.61 ($\text{TrtC}^{\text{ipso}}$), 129.66 (TrtC^{m}), 128.12 (TrtC^{o}), 126.94 (TrtC^{p}), 67.71 ($\text{S-C(Ph}_3\text{)}$), 61.77 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$), 39.85 ($\text{O=C-CH}_2\text{-C}$), 30.54 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 28.70 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 14.27 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$).

2-(5-Oxo-3-(2-(tritylthio)ethyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl) essigsäure (38)



$$M = 444.55 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Das Pyrazolon **37** (809 mg, 1.69 mmol) wird in THF:MeOH:H₂O (2:3:1) gelöst und Lithiumhydroxid (104 mg, 2.6 mmol) wird zugegeben. Die Reaktion wird 5 h bei RT gerührt. Nach Trocknen im Vakuum und Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (25 cm Kieselgel, Eluent DCM/THF/ Essigsäure, 9.5:0.5:0.1 v/v/v) wird die Säure **38** als farbloser Feststoff erhalten.

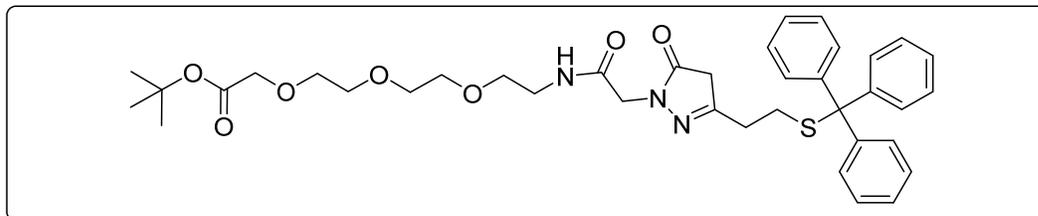
Ausbeute: 541 mg (1.22 mmol, 72 %), farbloser Feststoff

DC: $R_f = 0.42$ (DCM/THF/Essigsäure, 9.5:0.5:0.1 v/v/v).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.43-7.20 (m, 15H, TrtH), 4.40 (s, 2H, $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 3.01 (s, 2H, $\text{O=C-CH}_2\text{-C}$), 2.44-2.33 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.56 (CO_2), 168.45 ($\text{O=C-CH}_2\text{-C}$), 157.73 (C=N), 144.62 (TrtC^{ipso}), 129.67 (TrtC^m), 128.14 (TrtC^o), 126.96 (TrtC^p), 67.21 ($\text{S-C(Ph}_3\text{)}$), 39.86 ($\text{O=C-CH}_2\text{-C}$), 30.55 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 28.70 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$).

***tert*-Butyl 2-(2-(2-(2-(5-Oxo-3-(2-(tritylthio)ethyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)acetamido)-ethoxy)ethoxy)acetat (39)**



$M = 689.87 \cdot \text{mol}^{-1}$ $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$

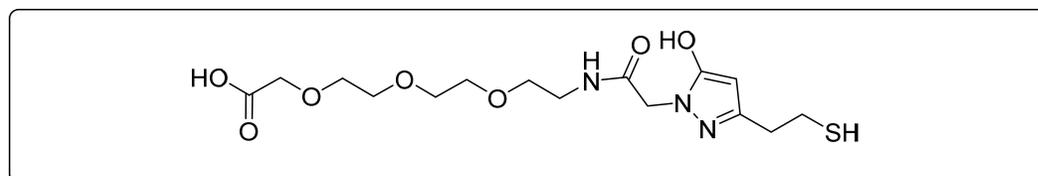
Das Pyrazol **38** (200 mg, 0.44 mmol) und der PEG-Linker **4** (150 mg, 0.06 mmol) werden in DMF (4 mL) gelöst und DIPEA (235 μL , 1.35 mmol) sowie HATU (0.51 g, 1.35 mmol) zur Reaktionslösung hinzugegeben. Der Ansatz wird 1 h bei RT gerührt. Abschließend wird das Rohprodukt mittels RP-HPLC aufgereinigt (0-100% Eluent B). Nach Trocknen im Hochvakuum wird der Knoevenagel-Baustein **39** erhalten.

Ausbeute: 43 mg (0.07 mmol, 15 %)

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 4.52$ min

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.31-7.17 (m, 15H, TrtH), 4.34 (s, 2H, $\text{O=C-CH}_2\text{-O}$), 3.92 (s, 2H, $\text{O=C-CH}_2\text{-N}$), 3.53-3.41 (m, 8H, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O})_2$), 3.34 (t, $^3J = 5.65$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.16 (t, $^3J = 5.65$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3.03 (s, 2H, $\text{O=C-CH}_2\text{-C}$), 2.39-2.23 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$), 1.36 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

1-(3-(2-Mercaptoethyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-aza-tetradecan-14-säure (40)



$M = 391.44 \cdot \text{mol}^{-1}$ $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$

Das Pyrazol **39** (43 mg, 0.07 mmol) wird in DCM (1.3 mL) vorgelegt. Unter Eisbadkühlung werden H_2O (100 μL) und TIPS (100 μL) hinzugegeben. Im nächsten Schritt wird TFA (800 μL) langsam zur Reaktionslösung getropft. Der Ansatz wird für 1 h bei RT gerührt,

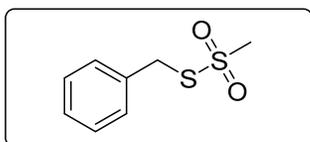
mit DMF (1 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt **40** wird mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt.

Ausbeute: 16 mg (0.04 mmol, 61 %)

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 2.1$ min

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.56 (s, 1H, HO-C=CH), 4.90 (s, 2H, O=C-CH₂-O), 4.16 (s, 2H, O=C-CH₂-N), 3.80-3.55 (m, 10H, (CH₂-CH₂O)₂-CH₂), 3.49 (t, $^3J=5.75$ Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 2.88-2.71 (m, 4H, CH₂-CH₂-SH).

Methansulfonsäurebenzylthioester (**42**)^[158]



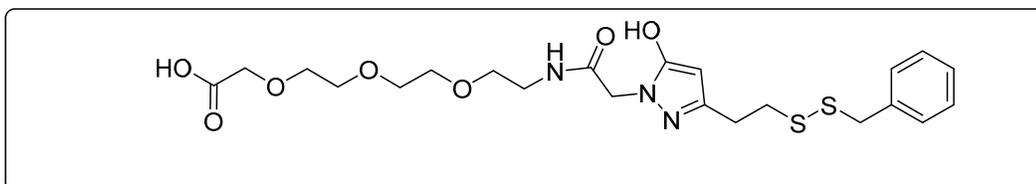
$M = 202.29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$

Methanthiosulfonat (**41**) (370 mg, 3.30 mmol) wird in ACN/H₂O (3 mL/3mL) gelöst und mit frisch destilliertem Benzylbromid (510 μL , 4.23 mmol) versetzt. Die Reaktion wird für 5 h bei 50 °C gerührt. Der Ansatz wird mit DCM (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknen im Vakuum wird das Produkt **42** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 498 mg (2.46 mmol, 75 %), farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.43-7.30 (m, 5H, PhH), 4.38 (s, 2H, CH₂), 2.91 (s, 3H, CH₃).

1-(3-(2-(Benzyldisulfaneyl)ethyl)-5-hydroxy-1H-pyrazol-1-yl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecan-14-oic säure (**43**)



$M = 513.62 \cdot \text{mol}^{-1}$ $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$

Das Pyrazol **40** (16 mg, 0.041 mmol) wird mit Methansulfonsäurebenzylthioester (**42**) (27 mg, 0.13 mmol) in MeOH bei pH 9 gelöst und der Ansatz über Nacht bei RT gerührt. Das Rohprodukt **43** wird mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt.

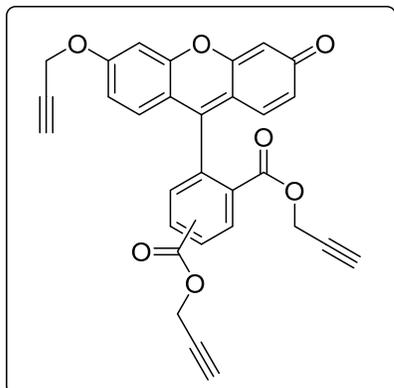
Ausbeute: 21 mg (0.041 mmol, 99 %)

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 3.31$ min

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.34-7.27 (m, 5H, PhH), 5.51 (s, 1H, HO-C=CH), 4.89 (s, 2H, O=C-CH₂-O), 4.16 (s, 2H, O=C-CH₂-N), 3.89 (s, 2H, S-S-CH₂), 3.80-3.54 (m, 10H, (CH₂-CH₂O)₂-CH₂), 3.51-3.45 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.79 (t, ³J=7.3 Hz, 2H, CH₂-CH₂-SH), 2.49 (t, ³J=7.3 Hz, 2H, CH₂-CH₂-SH).

5.1.5 Synthese von Fluorophoren als Reportergruppe

**Diprop-2-ynyl 2-(3-oxo-6-(prop-2-ynyloxy)-3H-xanthen-9-yl)terephthalat/
Diprop-2-ynyl 4-(3-oxo-6-(prop-2-ynyloxy)-3H-xanthen-9-yl)isophthalat
(45)^[159]**



M = 490.46 g · mol⁻¹

C₃₀H₁₈O₇

In einem 100 mL Schlenkcolben wird ein Isomerengemisch von 5(6)-Carboxyfluorescein (44) (0.30 g, 0.79 mmol) und K₂CO₃ (0.33 g, 2.3 mmol) in destilliertem DMF (5 mL) vorgelegt. Anschließend wird Propargylbromid (0.43 mL, 3.9 mmol) zugetropft und das Reaktionsgemisch 17 h bei RT gerührt. Die entstandene Lösung wird in Ethylacetat (70 mL) aufgenommen, mit Wasser (3 x 15 mL) und einer gesättigten NaCl-Lösung (3 x 15 mL) gewaschen, die organische Phase wird anschließend über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Aufreinigung durch Flash-Chromatographie (15 cm Kieselgel, Eluent DCM/MeOH, 49:1 v/v) wird das Alkin 45 als orangener Feststoff erhalten.

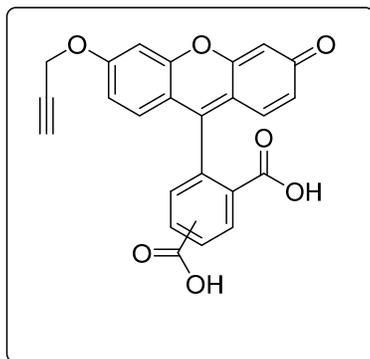
Ausbeute: 380 mg (0.78 mmol, 97 %), orangener Feststoff.

DC: R_f = 0.55 DCM/MeOH 9:1 v/v).

RP-HPLC (Methode A): t_R = 3.56 min

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.92 (d, ³J = 1.7 Hz, 0.4H, C^{ar}H), 8.44 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 0.6H, C^{ar}H), 8.36-8.34 (m, 1H, C^{ar}H), 8.03 (s, 0.4H, C^{ar}H), 7.48 (d, ³J = 7.9 Hz, 0.6H, C^{ar}H), 7.08 (d, ³J = 2.18 Hz, 1H, C^{ar}H), 6.82 (m, 3H, C^{ar}H), 6.56 (dt, ³J = 9.7 Hz, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, C^{ar}H), 6.48 (m, 1H, C^{ar}H), 5.04 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1.2H, CH₂), 4.97 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 0.8H, CH₂), 4.80 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 2H, CH₂), 4.63 (m, 2H, CH₂), 2.61 (t, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, C≡CH), 2.58 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 0.6H, C≡CH), 2.55 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 0.4H, C≡CH), 2.36 (q, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, C≡CH).

2-(3-Oxo-6-(prop-2-inyloxy)-3H-xanthen-9-yl)terephthalsäure/
4-(3-Oxo-6-(prop-2-inyloxy)-3H-xanthen-9-yl)isophthalsäure (**46**)^[159]



$$M = 414.36 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{O}_7$$

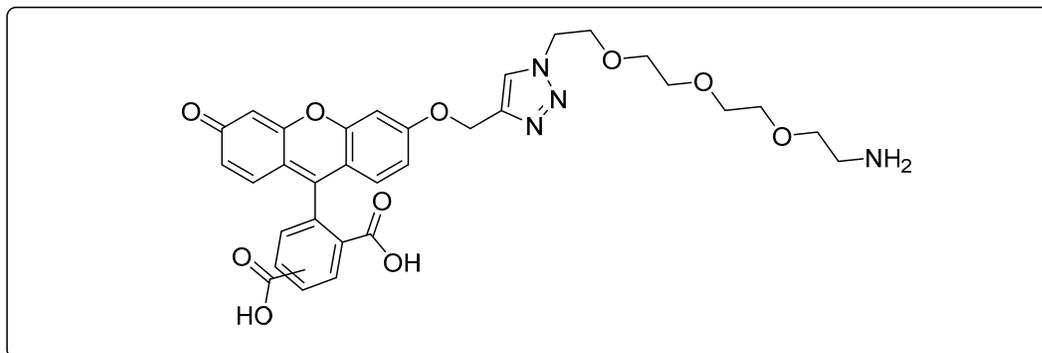
In einem 50 mL Einhalskolben wird das Alkin **45** (0.38 g, 0.78 mmol) in THF (13 mL) vorgelegt und mit LiOH (0.16 g, 3.9 mmol), gelöst in Wasser (35 mL), versetzt. Die entstandene Suspension wird 2 h bei RT gerührt, anschließend in Wasser (35 mL) gelöst und mit einer HCl-Lösung angesäuert (1 M, pH = 2). Die wässrige Phase wird mit EtOAc (3 x 40 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingedunstet. Reinigung mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) und Trocknen im Hochvakuum liefert das Fluorophor **46** als gelben Feststoff.

Ausbeute: 240 mg (0.57 mmol, 74 %), gelber Feststoff.

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 2.92$ min

¹H-NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 8.41 (d, ³J = 4.4 Hz, 0.6H, C^{ar}H), 8.30 (d, ³J = 6.9 Hz, 0.6H, C^{ar}H), 8.23 (t, ³J = 6.6 Hz, 0.4H, C^{ar}H), 8.14-8.10 (m, 0.4H, C^{ar}H), 7.69-7.66 (m, 0.4H, C^{ar}H), 7.42 (s, 0.6H, C^{ar}H), 7.01 (d, ³J = 4.8 Hz, 1H, C^{ar}H), 6.71-6.75 (m, 3H, C^{ar}H), 6.66-6.55 (m, 1H, C^{ar}H), 6.57 (dt, ³J = 5.7 Hz, ⁴J = 2.9 Hz, 1H, C^{ar}H), 4.89 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 2H, CH₂), 3.64-3.60 (m, 1H, C≡CH).

Carboxyfluorescein-PEG Linker 48



$$M = 632.63 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{10}$$

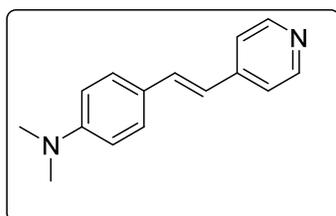
Das Fluorophor **46** (174 mg, 0.39 mmol) und 2-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethanamin (**47**) (115 μL , 0.58 mmol) werden in DMF (2 mL) vorgelegt. Dann werden Kupfer(I)-iodid (4 mg, 0.021 mmol) DIPEA (10 μL) und dH_2O (10 μL) hinzugegeben und der Ansatz für 2 h bei RT gerührt. Nach Reinigung mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) und Trocknen im Hochvakuum wird der Carboxyfluorescein-PEG-Linker **48** als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 153 mg (0.24 mmol, 63 %), gelber Feststoff.

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 3.57 \text{ min}$

MS-HR (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 633.2193$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{10}]^+$: 633.2197)

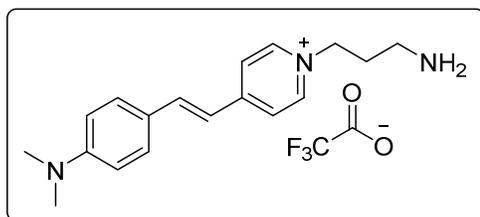
4-[4-(Dimethylamino)styryl]pyridine (**51**)



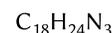
$$M = 224.31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2$$

In einem abgedunkelten Rundkolben werden 4-(Dimethylamino)benzaldehyd (**49**) (1.5 g, 10.05 mmol) und 4-Methylpyridin (**50**) (0.98 mL, 10.05 mmol) in Ethanol (17 mL) gelöst. Dann wird Piperidin (2.98 mL, 30.15 mmol) hinzugegeben und der Ansatz 2 d bei 80 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum wird das Benzenamin **51** als gelber Feststoff erhalten. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufarbeitung für die nächste Stufe eingesetzt.

1-(3-Aminopropyl)-4-[2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl]-pyridin (53)



$$M = 282.41 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



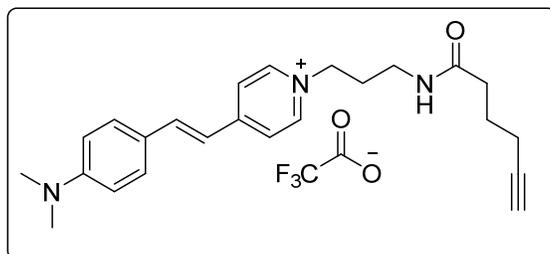
Das Edukt **51** (2.25 g, 10.05 mmol) wird in ACN (15 mL) vorgelegt und mit 1-Propanamin (**52**) (4.40 g, 20.09 mmol) versetzt. Die Reaktion wird für 4 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum und Reinigung mittels RP-HPLC (0-50% Eluent B) wird das Amin **53** (105 mg, 0.46 mmol) als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 72 mg (0.20 mmol, 43 %), roter Feststoff.

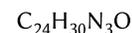
RP-HPLC (Methode A): $t_R = 2.25$ min

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.67-8.62 (m, 2H, -C^{Pyr}H-C^{Pyr}H-N⁺), 8.09-8.06 (m, 2H, C^{Pyr}H-C^{Pyr}H-N⁺), 7.86-7.79 (m, 3H, C^{ar}H, Ar-CH=CH-Pyr), 7.48-7.42 (m, 2H, C^{ar}H), 7.37-7.31 (m, 1H, Ar-CH=CH-Pyr), 4.61 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, CH₂-N⁺), 3.23 (s, 6H, (CH₃)₂-N), 3.20-3.09 (m, 2H, CH₂-NH₂), 2.45-2.36 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

1-(3-Aminopropyl)-4-[2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl]-pyridin-hexinsäureamid (55)



$$M = 376.52 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



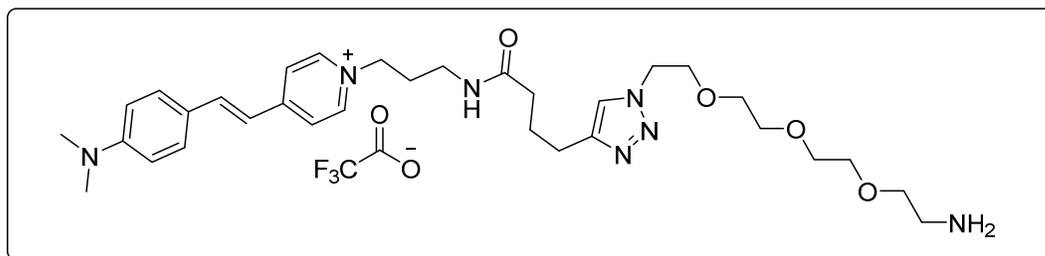
Das Amin **53** (72 mg, 0.20 mmol) wird in DMF (2 mL) vorgelegt. Anschließend werden TBTU (189 mg, 0.59 mmol), DIPEA (100 μ L, 0.57 mmol) und 5-Hexinsäure (**55**) (65 μ L, 0.59 mmol) hinzugegeben und der Reaktionsansatz 1 h bei RT gerührt. Abschließend wird der Reaktionsansatz mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) aufgereinigt. Trocknen im Hochvakuum liefert Alkin **55** als roten Feststoff.

Ausbeute: 61 mg (0.13 mmol, 65 %), roter Feststoff.

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 2.95$ min

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 376.3$ [M]⁺ (berechnet für [C₂₄H₃₀N₃O]⁺: 376.2389)

Fluorophor-PEG Linker 56



$$M = 594.78.68 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_4$$

Der Fluorophor **55** (165 mg, 0.44 mmol) und 2-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethanamin (**47**) (105 μL , 0.53 mmol) werden in DMF (2 mL) vorgelegt. Dann werden Kupfer(I)-iodid (4 mg, 0.021 mmol) DIPEA (10 μL) und dH_2O (10 μL) hinzugegeben und der Ansatz wird für 2 h bei RT gerührt. Nach Reinigung mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) und Trocknen im Hochvakuum wird der Fluorophor-PEG-Linker **56** als rotes Öl erhalten.

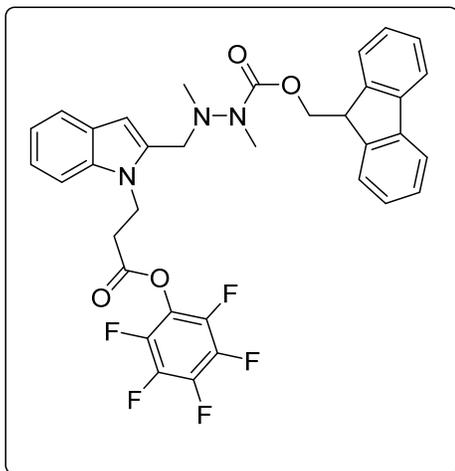
Ausbeute: 53 mg (0.089 mmol, 20 %), rotes Öl.

RP-HPLC (Methode A): $t_{\text{R}} = 2.57 \text{ min}$

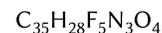
MS-HR (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 594.37638 \text{ [M]}^+$ (berechnet für $[\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_4]^+$: 594.3768)

5.1.6 Synthese der HIPS-Fluorophor Bausteine

3-(2-((2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-1,2-dimethylhydrazinyl)methyl)-indol-1-yl)pentafluorphenoxy-propyl (57)



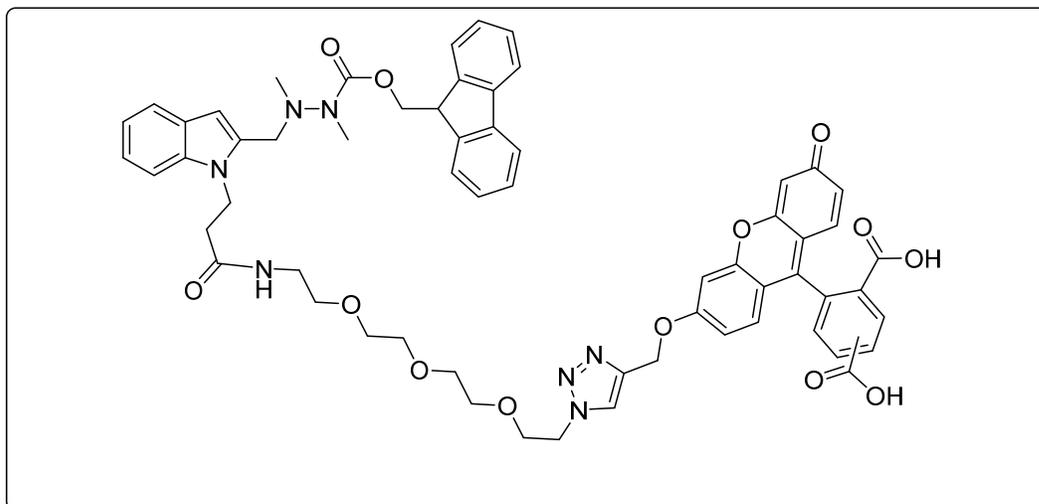
$$M = 649.62 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



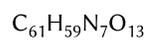
Das Indol **24** (40 mg, 0.083 mmol) wird in abs. EtOAc (1.5 mL) vorgelegt und auf 4 °C gekühlt. Dann werden Pentafluorphenol (33.6 mg, 0.182 mmol) und DCC (34 mg, 0.26 mmol) hinzugegeben und der Reaktionsansatz über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt in ACN (2 mL) aufgenommen und der Feststoff durch Zentrifugation (5 min x max g) abgetrennt. Nach Reinigung mittels RP-HPLC (50-100% Eluent B) und Trocknen im Hochvakuum wird der Aktivester **57** isoliert.

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 5.53 \text{ min}$

Fmoc-HIPS-Fluorophor Baustein 58



$$M = 1098.18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



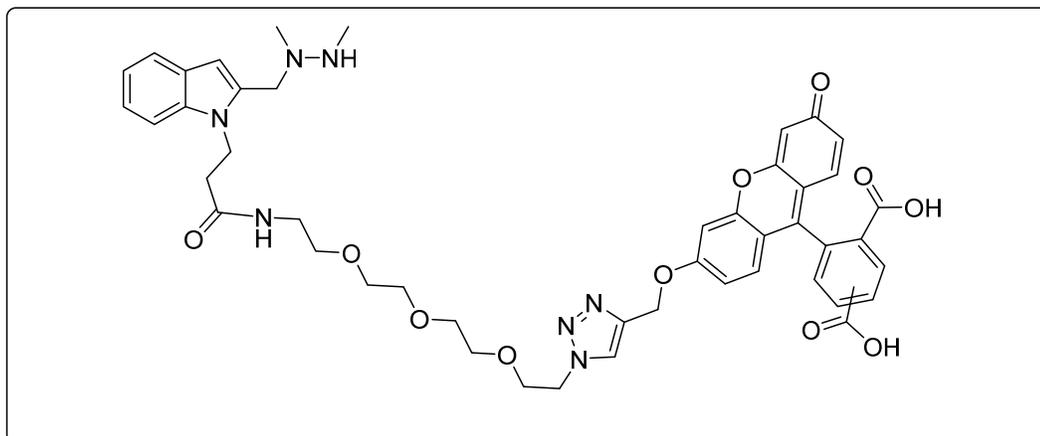
Das Indol **57** (42.22 mg, 0.065 mmol) und das Fluorophor **48** (43.4 mg, 0.068 mmol) werden in destilliertem DMF (4 mL) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Rohprodukt mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt. Der Fmoc-HIPS-Fluorophor Baustein **58** wird als gelber Feststoff isoliert.

Ausbeute: 63 mg (0.057 mmol, 87 %), gelber Feststoff.

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 4.53 \text{ min}$

MS-HR (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 1098.4256$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{61}\text{H}_{60}\text{N}_7\text{O}_{13}]^+$: 1098.4249)

HIPS-Fluorophor Baustein 59



$$M = 875.94 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_{11}$$

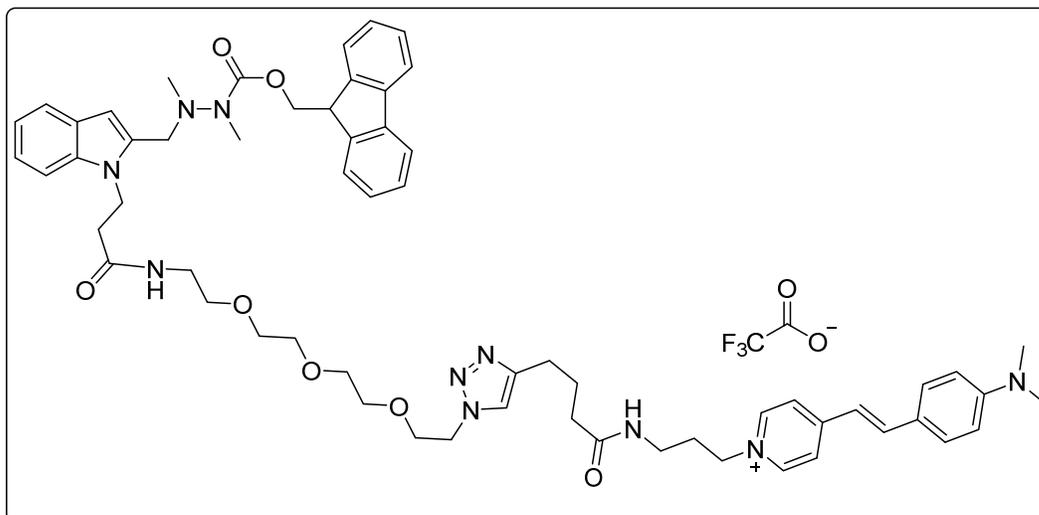
Der Fmoc-Geschützte HIPS-Fluorophor-Baustein **58** (63 mg, 0.057 mmol) wird in DMF/Piperidin (200 μL , 8:2, v/v) gelöst und für 45 min bei RT gerührt. Das Rohprodukt **59** wird im Hochvakuum getrocknet und mittels RP-HPLC (20-100% Eluent B) gereinigt.

Ausbeute: 36 mg (0.041 mmol, 72 %), gelber Feststoff.

RP-HPLC (Methode A): $t_{\text{R}} = 3.31 \text{ min}$

MS-HR (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 876.3573$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_{11}]^+$: 876.3568)

Fmoc-HIPS-Fluorophor Baustein **60**



$M = 1173.55 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$\text{C}_{63}\text{H}_{75}\text{F}_3\text{N}_{10}\text{O}_{10}$

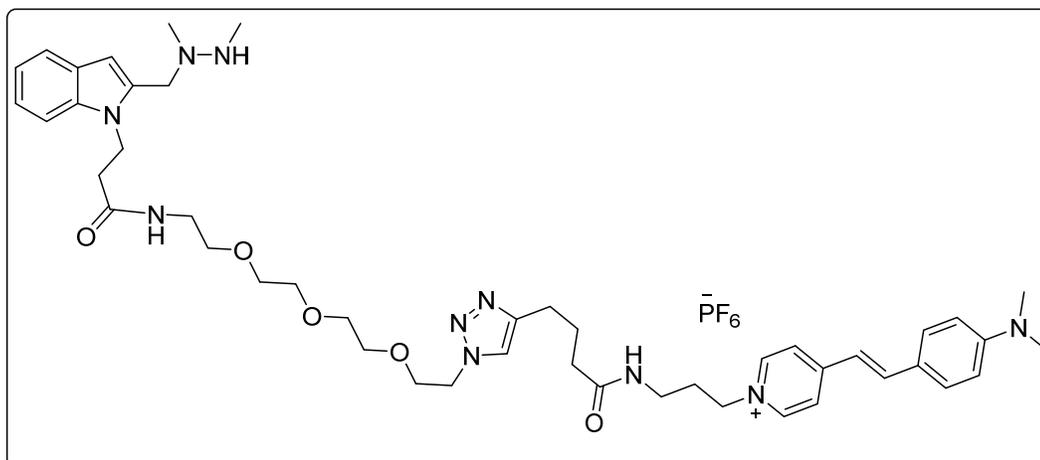
Das Indol **57** (37.81 mg, 0.058 mmol) und das Fluorophor **56** (16 mg, 0.023 mmol) werden in destilliertem DMF (4 mL) gelöst und für 4 h bei RT gerührt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Rohprodukt **60** mittels RP-HPLC (0-50% Eluent B) gereinigt. Der Fmoc-HIPS-Fluorophor Baustein **60** wird als roter Feststoff isoliert.

Ausbeute: 13 mg (0.011 mmol, 48 %), roter Feststoff.

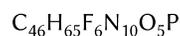
RP-HPLC (Methode A): $t_R = 4.3 \text{ min}$

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 530.305 [M+H]^{2+}$ (berechnet für $[\text{C}_{61}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{O}_7]^{2+}$: 530.295)

HIPS-Fluorophor Baustein 61



$$M = 983.05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



Der Fmoc-geschützte HIPS-Fluorophor-Baustein **60** (13 mg, 0.011 mmol) wird in DMF/Piperidin (200 μL , 8:2, v/v) gelöst und für 45 min bei RT gerührt. Das Rohprodukt **61** wird im Hochvakuum getrocknet und mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt. Abschließend wird der rote Feststoff in $\text{dH}_2\text{O}/\text{ACN}$ (1 mL, 95:5, v/v, 0.1% v/w NH_4PF_6) aufgenommen und an $\text{SiO}_2\text{-C18}$ gebunden. Nach Waschen wird das Produkt mit $\text{dH}_2\text{O}/\text{Acetonitril}$ (5 mL, 5:95, v/v, 1% v/w NH_4PF_6) eluiert. Der HIPS-Fluorophor Baustein **61** wird als roter Feststoff isoliert.

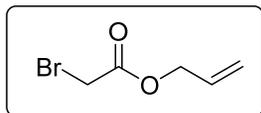
Ausbeute: 7.35 mg (7.48 μmol , 68 %), roter Feststoff.

RP-HPLC (Methode A): $t_{\text{R}} = 2.89 \text{ min}$

MS-HR (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 419.2603$ $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ (berechnet für $[\text{C}_{46}\text{H}_{66}\text{N}_{10}\text{O}_5]^{2+}$: 419.2609)

5.1.7 Synthese von stabilisierten Yliden

Allyl-bromoacetat (64)



$$M = 179.01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_5\text{H}_7\text{BrO}_2$$

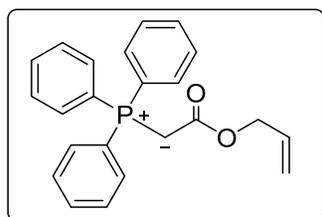
Bromessigsäure (**62**) (5 g, 36 mmol) und Allylalkohol (**63**) (12.6 g, 266 mmol) werden mit DMAP (502 mg, 4 mmol) in abs. DCM (15 mL) vorgelegt. Bei 4°C wird DCC (8.8 g, 46 mmol) gelöst in abs. DCM (40 mL), im Zeitraum von 90 min zugetropft. Anschließend wird die Reaktion 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und abschließend wird das Rohprodukt **64** durch fraktionierte Vakuumdestillation (1 mbar, 70°C) gereinigt. Allyl-bromoacetat (**64**) wird als farblose Flüssigkeit isoliert.

Ausbeute: 4.8 g (27 mmol, 74 %), farblose Flüssigkeit

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.92 (m, 1H, CH=CH₂), 5.33 (m, 2H, CH=CH₂), 4.68-4.66 (dt, ³J = 5.8 Hz ⁴J = 1.4 Hz, 2H, O-CH₂), 3.86 (s, 2H, Br-CH₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.05 (CO₂), 131.29 (CH=CH₂), 119.30 (CH=CH₂), 66.85 (O-CH₂), 25.83 (Br-CH₂).

Allyl-(triphenylphosphoranyliden)acetat (65)



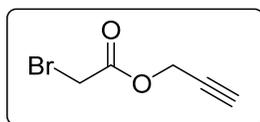
$$M = 360.39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{P}$$

Das Alken **64** (913 mg, 5.6 mmol) und Triphenylphosphan (1.38 g, 5.2 mmol) werden in abs. DCM (30 mL) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt in dH₂O (40 mL) aufgenommen. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird mit NaOH (1M) auf 8 eingestellt. Es bildet sich ein farbloser Niederschlag. Der Ansatz wird mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Abschließend wird die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Allyl-(triphenylphosphoranylidene)acetat (**65**) wird als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 1.35 g (3.75 mmol, 67 %), farbloser Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.96-7.70 (m, 15H, P-(C₆H₅)₃), 5.70 (m, 1H, P-(C₆H₅)₃=CH), 5.64 (m, 1H, CH=CH₂), 5.15 (m, 2H, CH=CH₂), 4.49-4.44 (dt, ³J = 5.9 Hz ⁴J = 1.2 Hz, 2H, O-CH₂).

³¹P-NMR (121 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.97 (P-(C₆H₅)₃).

Propargyl-bromoacetat (66)

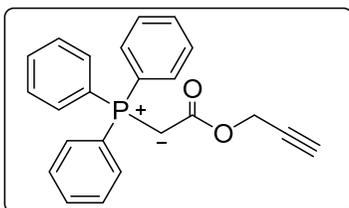
$$M = 177.00 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_5\text{H}_5\text{BrO}_2$$

Bromessigsäure (**62**) (3.2 g, 23 mmol) und Propargylalkohol (4 mL, 69 mmol) werden mit DMAP (308 mg, 2.5 mmol) in abs. DCM (40 mL) vorgelegt. Bei 4°C wird DCC (4.2 g, 25 mmol), gelöst in abs. DCM (30 mL), innerhalb von 90 min zugetropft. Anschließend wird die Reaktion 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und abschließend wird das Rohprodukt **66** durch fraktionierte Vakuumdestillation (1 mbar, 80°C) gereinigt. Propargyl-bromoacetat (**66**) wird als farblose Flüssigkeit isoliert.

Ausbeute: 2.63 g (14.9 mmol, 65 %), farblose Flüssigkeit

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.78-4.75 (m, 2H, Br-CH₂), 3.88-3.86 (m, 2H, CH₂-C≡CH), 2.53 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, CH₂-C≡CH).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 166.58 (CO₂), 76.76 (CH₂-C≡CH), 75.92 (CH₂-C≡CH), 53.71 (Br-CH₂), 25.30 (CH₂-C≡CH).

Essigsäure-(triphenylphosphoranyliden)-2-propinylester (67)

$$M = 358.37 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{P}$$

Das Alkin **66** (1.01 g, 5.65 mmol) und Triphenylphosphan (1.48 g, 5.65 mmol) werden in abs. DCM (20 mL) gelöst und für 15 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt in dH₂O (75 mL) aufgenommen. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird mit NaOH (1M) auf 8 eingestellt. Es bildet sich ein weißer Niederschlag. Die wässrige Phase wird mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Abschließend wird die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Essigsäure-(triphenylphosphoranyliden)-2-propinylester (**67**) wird als farbloser Feststoff isoliert. Das Rohprodukt **67** wird ohne weitere Aufarbeitung für die nächste Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 1.34 g (3.75 mmol, 57 %), farbloser Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.01-7.33 (m, 15H, P-(C₆H₅)₃), 5.82 (bs, 1H, P-(C₆H₅)₃-CH), 4.58 (bs, 2H, CH₂-C≡CH), 2.35 (bs, 1H, CH₂-C≡CH).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 166.73 (CO₂), 135.20 (ArC^m), 134.14 (ArC^p), 130.50 (ArC^o), 118.1 (d, J = 104.1 Hz, ArC^{ipso}), 75.94 (CH₂-C≡CH), 53.59 (CH₂-C≡CH), 40.70 (CH₂-C≡CH), 32.96 (d, J = 51.2 Hz, P-CH₂).

5.1.8 Synthese von Peptiden

Harzbeladung und Beladungsgradbestimmung

Die Peptidsynthese wird am Rink-Amid-Harz als fester Phase durchgeführt. Zur Harzbeladung wird das Rink-Amid-Harz in DMF vorgelegt und für 10 min quellen gelassen. Es wird Piperidin (20% v/v) hinzugegeben und das Harz 20 min bei RT gerührt. Die Reaktionslösung (DMF, Piperidin, 80/20, v/v) wird erneuert und das Harz 20 min bei RT gerührt, um die Fmoc-Schutzgruppe quantitativ abzuspalten. Dann wird das entschützte Harz gewaschen (3 x DCM und 3 x DMF). Die erste Aminosäure (1 Äq) wird mit TBTU (1 Äq) und DIPEA (2 Äq) in DMF (5 mL pro 1 g Harz) für 2 h bei RT gekuppelt. Das Harz wird erneut gewaschen (3 x DCM und 3 x DMF). Abschließend werden die freien primären Amine am Harz mit Essigsäureanhydrid (10 Äq) und Pyridin (10 Äq) in DMF für 30 min bei RT acetyliert. Das Harz wird abschließend gewaschen (6 x DMF und 3 x mit DCM) und im Vakuum getrocknet.

Um die Beladung zu bestimmen, wird ca. 1 mg Harz in eine UV-Küvette eingewogen und mit DMF/Piperidin (3 mL, 80:20, v/v) versetzt. Dabei wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und es bildet sich das Piperidin-Dibenzofulven-Addukt, welches eine starke Absorption bei 290 nm besitzt. Mit Hilfe von Formel (1) lässt sich der Beladungsgrad des Harzes berechnen. Für die Synthese von Peptiden mit weniger als 10 Aminosäuren wird ein Beladungsgrad von 0.6 mmol/g und für Peptide mit mehr als 10 Aminosäuren ein Beladungsgrad von 0.4 mmol/g angestrebt.

$$\text{Beladungsgrad} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{A_{290}}{m \cdot 1.65} \quad (1)$$

Kupplung von Aminosäuren

Die automatisierte Kupplung von Aminosäuren wurde am Peptid-Synthesiser (LIBERTY, CEM GMBH) durchgeführt. Für alle Peptide wird die Fmoc-Strategie verwendet. Im ersten Schritt wurde die Fmoc-Schutzgruppe der vorangegangenen Aminosäure mit DMF/Piperidin (80:20, v/v, 0.1 M HOBt) abgespalten. Nach Waschen des Harzes mit DMF werden für den Mikrowellen-assistierten Kupplungsschritt TBTU (3 Äq, 0.5 M Lösung in DMF) und DIPEA (3 Äq, 2 M Lösung in NMP) in DMF eingesetzt. Die Acetylierung erfolgt optional mit einer Lösung aus Essigsäureanhydrid (0.5 M), DIPEA (125 mM), HOBt (15 mM) in DMF. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

Alternativ werden Aminosäuren manuell gekuppelt. Das Harz wird in wenig DMF vorgelegt, dann wird eine Lösung aus Fmoc-geschützter Aminosäure (3 Äq), DIPEA (6 Äq) und HATU (3 Äq) hinzugegeben und 1 h bei RT gerührt. Die Suspension wird filtriert und das Harz abschließend mit 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF gewaschen. Die Vollständigkeit der Reaktion wird durch eine MALDI-ToF-MS-Messung überprüft.

Tabelle 5-1: Reaktionsbedingungen bei der automatisierten, mikrowellenunterstützten Festphasenpeptidsynthese

Syntheseschritt	Volumen [mL]	Konzentration [M]	Leistung [W]	T [°C]	Dauer [s]
Entschützung	10	DMF/Piperidin 8:2, 0.1 M HOBT	35	75	180
Kupplung	5 2 1	0.2 M AS in DMF 0.5 M TBTU in DMF 2 M DIPEA in NMP	20	75	300
Acetylierung	10	0.5 M Essigsäure- anhydrid, 125 mM DIPEA, 15 mM HOBT in DMF	40	65	30

Abspaltung vom Harz

Nach der Kupplung der letzten Aminosäure und der Acetylierung des N-Terminus wird das Harz mit 3 x DMF und 3 x DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Unter Eisbadkühlung wird eine Lösung aus TFA (95%), dH₂O (2.5%), TIPS (2.5%), DTT (2 % w/v) und Phenol (1 % w/v) zum Harz gegeben (5 mL pro 1 g Harz) und dieses für 4 h unter einer Argon-Schutzatmosphäre geschüttelt. Die Suspension wird filtriert und das Harz mit wenig TFA gewaschen. Das Filtrat wird in eine gekühlte (-20 °C) Mischung aus Petrolether und MTBE (2:1, v/v, 50 mL pro 1 mL Abspalllösung) gegeben. Abschließend wird der Feststoff durch Zentrifugation (30 min, 8 000 x g) vom Überstand getrennt und im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Material wird in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1, v/v) aufgenommen und mittels präparativer RP-HPLC (0-100 % Eluent B) gereinigt.

Synthese des Peptids Ac-YLCTPSRAALLTGR-NH₂ (68)

Die Synthese des Peptides **68** erfolgt am Rink-Amid-Harz. Das Harz wird zunächst manuell mit der Aminosäure Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen. Der Beladungsgrad beträgt 0.35 mmol/g. Es werden die Aminosäuren Fmoc-Arg(Pbf)-OH und Fmoc-Cys(StBu)-OH eingesetzt. Die restlichen Aminosäureseitenketten sind, wenn erforderlich *tert*-Butoxycarbonyl-geschützt. Die Aminosäure Arg wird dreimal gekuppelt, die restlichen sechs Aminosäuren in der Sequenz werden zweimal gekuppelt. Nach jedem Kupplungsschritt wird eine Acetylierung durchgeführt. Nach erfolgreicher Synthese wird das Peptid vom Harz abgespalten (TFA (95%), dH₂O (2.5%), TIPS (2.5%) und Phenol (1 % w/v)), gefällt und durch präparative RP-HPLC (0-100 % Eluent B) gereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird der farblose Feststoff in dH₂O (1 mL, 0.1 M TCEP) gelöst und über Nacht gerührt, um die StBu-Schutzgruppe abzuspalten. Abschließend wird das Peptid **68** durch RP-HPLC (0-50% Eluent B) gereinigt.

Summenformel: C₆₈H₁₁₅N₂₁O₁₉S**Molmasse:** 1562.84 g/mol

Ausbeute: 18 mg (0.012 mmol, 5 %), farbloser Feststoff.

RP-HPLC (Methode B): $t_R = 4.51$ min

MS-HR (MALDI-ToF-MS, Kationen-Modus): $m/z = 1562.8470$ $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{68}H_{116}N_{21}O_{19}S]^+$: 1562.8477)

Synthese des Peptids Ac-YACAPSRGGALTGR-NH₂ (69)

Die Synthese des Peptides (**69**) erfolgt am Rink-Amid-Harz. Das Harz wird zunächst manuell mit der Aminosäure Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen. Der Beladungsgrad beträgt 0.35 mmol/g. Es werden die Aminosäuren Fmoc-Arg(Pbf)-OH und Fmoc-Cys(StBu)-OH eingesetzt. Die restlichen Aminosäureseitenketten sind, wenn erforderlich *tert*-Butoxycarbonyl-geschützt. Die Aminosäure Arg wird dreimal gekuppelt, die restlichen sechs Aminosäuren in der Sequenz werden zweimal gekuppelt. Nach jedem Kupplungsschritt wird eine Acetylierung durchgeführt. Nach erfolgreicher Synthese wird das Peptid vom Harz abgespalten (TFA (95%), dH₂O (2.5%), TIPS (2.5%) und Phenol (1 % w/v)), gefällt und durch präparative RP-HPLC (0-100 % Eluent B) gereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird der farblose Feststoff in dH₂O (1 mL, 0.1 M TCEP) gelöst und über Nacht gerührt um die StBu-Schutzgruppe abzuspalten. Abschließend wird das Peptid **69** durch RP-HPLC (0-50% Eluent B) gereinigt.

Summenformel: C₅₉H₉₇N₂₁O₁₈S

Molmasse: 1420.60 g/mol

Ausbeute: 32 mg (0.022 mmol, 9 %), farbloser Feststoff.

RP-HPLC (Methode B): $t_R = 2.55$ min

MS (MALDI-ToF-MS, Kationen-Modus): $m/z = 1420.79$ $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{59}H_{98}N_{21}O_{18}S]^+$: 1420.7119)

Synthese des Peptids Ac-YLCTPSR-NH₂ (70)

Die Synthese des Peptides **70** erfolgte wie zuvor beschrieben automatisiert und mikrowellenunterstützt am Rink-Amid-Harz. Das Harz wird zunächst manuell mit der Aminosäure Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen. Der Beladungsgrad beträgt 0.48 mmol/g. Es werden die Aminosäuren Fmoc-Arg(Pbf)-OH und Fmoc-Cys(Trt)-OH eingesetzt. Die restlichen Aminosäureseitenketten sind, wenn erforderlich *tert*-Butoxycarbonyl geschützt. Die Aminosäure Thr wird zweimal gekuppelt. Nach erfolgreicher Synthese wird das Peptid **68** vom Harz abgespalten, in PE/MTBE gefällt und durch präparative RP-HPLC (0-100 % Eluent B) gereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Peptid **70** als farbloser Feststoff erhalten.

Summenformel: C₃₈H₆₁N₁₁O₁₁S

Molmasse: 880.03 g/mol

Ausbeute: 42 mg (0.048 mmol, 19 %), farbloser Feststoff.

RP-HPLC (Methode B): $t_R = 3.71$ min

MS-HR (MALDI-ToF-MS, Kationen-Modus): $m/z = 880.43463$ $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{38}H_{62}N_{11}O_{11}S]^+$: 880.43455)

5.1.9 Synthese von Aldehyd-Peptiden

Synthese von Ac-YL(FGly)TPSRAALLTGR-NH₂ (71)

Das Peptid **68** (15 mg, 9.60 μ mol) wird in Bicin-Puffer pH 9.3 (10 mL) mit Arginin (0.2 M) und DTT (3 mM) vorgelegt und auf 37 °C erwärmt. Der pH-Wert der Lösung wird überprüft und bei Bedarf mit NaOH (1 M) auf 9.3 eingestellt. Es wird mtbFGE (3.4 mg, 0.097 μ mol) hinzugefügt und die Reaktion 12 h bei 37 °C gerührt. Abschließend wird der Reaktionsansatz mit dH₂O/TFA (8:2 v/v, 1 mL) abgestoppt und präzipitiertes mtbFGE wird durch Zentrifugation (20 min, 8 000 x g) abgetrennt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Peptid **71** mittels RP-HPLC (0-50% Eluent B) gereinigt.

Summenformel: C₆₈H₁₁₃N₂₁O₂₀

Molmasse: 1544.77 g/mol

Ausbeute: 11.3 mg (7.31 μ mol, 76 %), farbloser Feststoff.

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 4.14$ min

MS-HR (MALDI-ToF-MS, Kationen-Modus): $m/z = 1544.85651$ $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{68}H_{113}N_{21}O_{20}]^+$: 1544.8549)

Synthese von Ac-YA(FGly)APSRGGALTGR-NH₂ (72)

Synthese mit h Δ FGE

Das Peptid **69** (1.17 mg, 0.823 μ mol) wird in Bicin-Puffer pH 9.3 (5 mL) mit Arginin (0.2 M) und DTT (3 mM) vorgelegt und auf 37 °C erwärmt. Der pH-Wert der Lösung wird überprüft und bei Bedarf mit NaOH (1 M) auf 9.3 eingestellt. Es wird h Δ FGE (100 μ g, 0.0027 μ mol) hinzugefügt und die Reaktion wird 24 h bei 37 °C gerührt. Abschließend wird der Reaktionsansatz mit dH₂O/TFA (8:2 v/v, 500 μ L) abgestoppt und präzipitiertes mtbFGE wird durch Zentrifugation (20 min, 8 000 x g) abgetrennt. Der Umsatz wird durch analytische-HPLC (Methode B) und durch MALDI-ToF-MS bestimmt.

Synthese mit mtbFGE

Analog zur Umsetzung mit h Δ FGE wird das Peptid **69** (1.13 mg, 0.795 μ mol) mit mtbFGE (100 μ g, 0.0030 μ mol) umgesetzt. Der Umsatz wird durch analytische-HPLC (Methode B) und durch MALDI-ToF-MS bestimmt.

Summenformel: C₅₉H₉₅N₂₁O₁₉

Molmasse: 1402.53 g/mol

Umsatz: mtbFGE: 84 %, TON 223

Umsatz: h Δ FGE: 34 %, TON 104

RP-HPLC (Methode B): $t_R = 3.63$ min

MS (MALDI-ToF-MS, Kationen-Modus): $m/z = 1402.8$ $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{59}H_{96}N_{21}O_{19}]^+$: 1402.719)

Synthese von Ac-YL(FGly)TPSR-NH₂ (73)

Das Peptid **70** (63 mg, 71.57 µmol) wird in Bicin-Puffer pH 9.3 (63 mL) mit Arginin (0.2 M) und DTT (3 mM) vorgelegt und auf 30 °C erwärmt. Der pH-Wert der Lösung wird überprüft und bei Bedarf mit NaOH (1 M) auf 9.3 eingestellt. Es wird mtbFGE (25 mg, 0.716 µmol) hinzugefügt und die Reaktion wird 4 h bei 30 °C gerührt. Abschließend wird der Reaktionsansatz mit dH₂O/TFA (8:2 v/v, 4 mL) abgestoppt und präzipitiertes mtbFGE wird durch Zentrifugation (20 min, 8 000 x g) abgetrennt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Peptid **73** mittels RP-HPLC (0-50% Eluent B) gereinigt.

Summenformel: C₃₈H₅₉N₁₁O₁₂

Molmasse: 861.96 g/mol

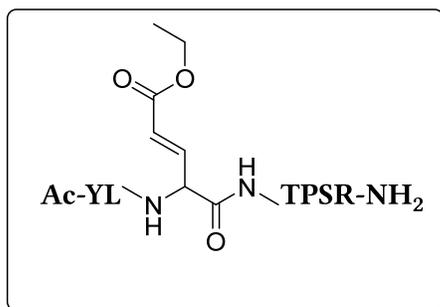
Ausbeute: 51 mg (59.18 µmol, 82 %), farbloser Feststoff.

RP-HPLC (Methode B): t_R = 3.1 min

MS-HR (MALDI-ToF-MS, Kationen-Modus): m/z = 862.4439 [M+H]⁺ (berechnet für [C₃₈H₆₀N₁₁O₁₂]⁺: 862.4434)

5.1.10 Wittig-Reaktionen mit Aldehyd-Peptiden

Synthese von Peptid 75



M = 932.05 g · mol⁻¹

C₄₂H₆₅N₁₁O₁₃

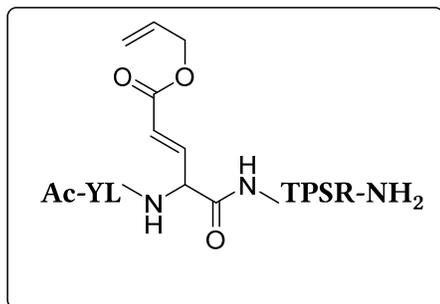
Das Aldehyd-Peptid **73** (4.5 mg, 5.2 µmol, 10 mM) wird in abs. Ethanol (520 µL) vorgelegt. Dann wird Ylid **74** (17.4 mg, 0.05 mmol, 40 mM) hinzugegeben und der Ansatz 2 h bei RT gerührt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Peptid **75** mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt.

Ausbeute: 3.44 mg (3.69 µmol, 71 %), farbloser Feststoff.

RP-HPLC (Methode B): t_R = 4.02 min

MS-HR (ESI-MS, Kationen-Modus): m/z = 932.4794 [M+H]⁺ (berechnet für [C₄₂H₆₆N₁₁O₁₃]⁺: 932.4841)

Synthese von Peptid 76



$$M = 944.06 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



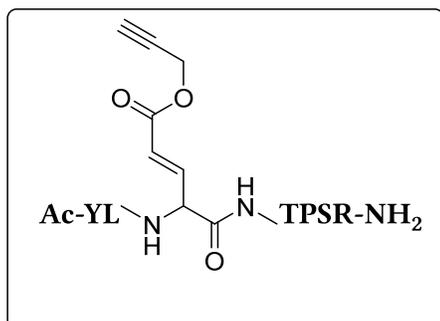
Das Aldehyd-Peptid **73** (7 mg, 8.1 μmol , 10 mM) wird in abs. Ethanol (810 μL) vorgelegt. Dann wird Ylid **65** (18 mg, 50 μmol) hinzugegeben und der Ansatz 4 h bei RT gerührt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Peptid **76** mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt.

Ausbeute: 3.36 mg (3.56 μmol , 44 %), farbloser Feststoff.

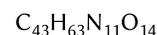
RP-HPLC (Methode B): $t_R = 4.28 \text{ min}$

MS-HR (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 944.48392$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_{11}\text{O}_{12}]^+$: 944.4841)

Synthese von Peptid 77



$$M = 942.04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$



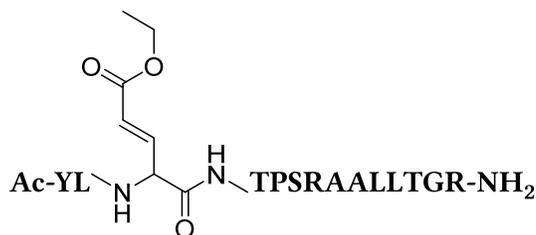
Das Aldehyd-Peptid **73** (5.8 mg, 6.7 μmol , 10 mM) wird in abs. Ethanol (670 μL) vorgelegt. Dann wird Ylid **67** (15 mg, 41 μmol) hinzugegeben und der Ansatz 2 h bei RT gerührt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird das Peptid **77** mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt.

Ausbeute: 1.5 mg (1.6 μmol , 28 %), farbloser Feststoff.

RP-HPLC (Methode B): $t_R = 4.08 \text{ min}$

MS-HR (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 942.4672$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_{11}\text{O}_{12}]^+$: 942.4685)

Synthese von Peptid 78



$$M = 1614.86 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{C}_{74}\text{H}_{119}\text{N}_{21}\text{O}_{21}$$

Das Aldehyd-Peptid **71** (4.1 mg, 2.65 μmol , 10 mM) wird in abs. Ethanol (260 μL) vorgelegt. Dann wird Ylid **74** (15 mg, 41 μmol) hinzugegeben und der Ansatz 2 h bei RT gerührt. Nach Trocknen im Hochvakuum wird Peptid **78** mittels RP-HPLC (0-100% Eluent B) gereinigt.

Ausbeute: 2.48 mg (1.58 μmol , 58 %), farbloser Feststoff.

RP-HPLC (Methode A): $t_R = 4.65 \text{ min}$

MS-HR (MALDI-ToF-MS, Kationen-Modus): $m/z = 807.95181 [M+H]^{2+}$ (berechnet für $[\text{C}_{74}\text{H}_{121}\text{N}_{21}\text{O}_{21}]^{2+}$: 807.95225)

5.2 Biochemische Arbeiten

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die exponentielle Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte *in vitro*. Für diese Technik wird eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet. Zuerst wird die DNA bei ca. 92-98 °C denaturiert. Im zweiten Schritt, der Primerhybridisierung, lagern sich bei 55-68 °C die Oligonucleotidprimer an die komplementären Bereiche der zu amplifizierenden einzelsträngigen DNA an. Die genaue Temperatur wird hierbei durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt. Die verwendete Temperatur liegt ca. 5-10 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer. Im letzten Schritt, der Elongationsphase findet die Neusynthese der komplementären DNA-Stränge statt. Dabei füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge zwischen den Primern mit freien Nukleotiden vom 3'-Ende zum 5'-Ende hin auf. Die Reaktion findet am Temperaturoptimum der verwendeten, rekombinanten DNA-Polymerase statt. Die Dauer dieser Phase richtet sich nach der Länge der zu synthetisierenden DNA. Etwa 1000 Nukleotide sind pro Minute möglich.^{[160][161]}

Für die Einführung der FGE-Konsensussequenz CTPSR wird die ortsgerichtete Mutagenese-PCR verwendet. Das Plasmid mit der cDNA-Sequenz des Proteins wird dabei unter Verwendung eines homologen Primer-Paares vollständig amplifiziert. Nur an der Position, wo die Mutation eingeführt werden soll, weist der Primer eine Sequenzabweichung auf und enthält die Codons für die gewünschte Mutation CTPSR. Mit dieser Technik können bis zu 15 Basenpaare addiert werden. Insgesamt sind die Primer bis zu 45 Nukleotide lang und der GC Gehalt liegt bei ca. 40%. Die Denaturierungstemperatur der Primer muss über 78 °C liegen und wird mit der Formel (2) berechnet.

$$T_m = 81.5 + 0.41 \times (\%GC) - \frac{675}{N} - \% \text{ mismatch} \quad (2)$$

Dabei gibt N die Länge des Primers in Nukleotiden an. Diese Mutagenese-PCR wird unter Anlehnung an das QUICK-CHANGE SITE DIRECTED MUTAGENESIS KIT (STRATAGENE) unter Verwendung der KAPPA HOT-START HiFi Polymerase durchgeführt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in Tabelle 5-2 aufgeführt und der Ablauf des PCR-Programms in Tabelle 5-3 aufgelistet.

Tabelle 5-2: Mutagenese-PCR-Reaktionsansatz

Reaktionskomponente	Volumen [µL]	Endkonzentration
KAPPA HiFi HOT START <i>Ready Mix</i>	25	1x
<i>Template</i> -DNA (1 ng/ µL)	2	40 pg/µL
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	1	0.25 µM
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1	0.25 µM
dH ₂ O	22	
Gesamtvolumen	50	

Tabelle 5-3: Temperaturprofil der Mutagenese-PCR

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	initiale Denaturierung	98 °C	3 min
25	Denaturierung	98 °C	30 s
	Primer-Annealing	55-64 °C	60 s
	Elongation	72 °C	6 s
1	finale Elongation	72 °C	5 min

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der DNA wird bei 260 nm und 280 nm UV/Vis-spektroskopisch am NANODROP bestimmt. Dazu werden 2 µL der Probe eingesetzt. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit der DNA bestimmen. So besitzt reine DNA ohne Kontaminationen von Proteinen eine $OD_{260/280}$ von 1.8 bis 2.0. Ist die DNA mit Proteinen kontaminiert, ist der Wert signifikant kleiner, bei einer zu 50% verunreinigten Probe liegt er bei 1.5.^[162]

DpnI-Verdau von Template-DNA

Das Restriktionsenzym *DpnI* erkennt methylierte DNA-Sequenzen (Gm6A↓TC),^[163] hierdurch kann die Template-DNA abgebaut werden, während das PCR-Amplifikat erhalten bleibt.

Nach der Mutagenese-PCR wird die Template-DNA 1 h bei 37°C mit *DpnI* abgebaut. Weiterhin erfolgt die Analyse der PCR durch Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung. Abschließend wird das PCR-Produkt in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert

Restriktionsanalyse

Der analytische Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wird zur Kontrolle der Insertion eines DNA-Fragments in einem Vektor oder zur Klonierung durchgeführt.

Tabelle 5-4 Zusammensetzung des Restriktionsverdau

Reagenz	Volumen	Konzentration
DNA	x	300 ng
NEB <i>Cutsmart buffer</i> 10x	2	1 x
Restriktionsenzym	0.2	
dH ₂ O	auf 20 µL	

Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der zurückgelegten Strecke im Agarosegel und dem Logarithmus der Länge des DNA-Fragments in Basenpaaren. Die Auftrennung lässt sich durch die Agarosekonzentration, die angelegte Spannung und den verwendeten Laufpuffer beeinflusst. Nach der Elektrophorese wird die DNA mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Durch die Interkalation in DNA ändert sich das Absorptionsspektrum und die Intensität der

Fluoreszenz nimmt um den Faktor 100 zu. Auf diese Weise können die aufgetrennten DNA-Fragmente visualisiert werden.

Agarose wird durch kurzes Aufkochen in TEA-Puffer gelöst (1-1.5% w/v). Mit dem Abkühlen bildet sich ein festes Gel durch die Quervernetzung über Wasserstoffbrückenbindungen der Agarosemoleküle aus. Für die Agarose-Gelelektrophorese wird das Gel mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. Dann werden die Geltaschen mit den mittels Ladepuffer beschwerten DNA-Proben und einem DNA-Größenstandard beladen. Die Elektrophorese wird bei 90 V für 40-60 Minuten durchgeführt. Abschließend wird das Gel kurz im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und nach waschen mit dH₂O unter UV-Licht ausgewertet.

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA zur Überprüfung der Konstrukte wird in der *Sequencing Core Facility* des CEBITECS der Universität Bielefeld durchgeführt. Hierzu werden 10 µL der Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 200-300 ng/µL zusammen mit den entsprechenden Primern in einer finalen Konzentration von 0.25 µM eingesetzt.

5.2.2 Kultivierung von Bakterien

Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* werden die Zellen auf LB-Platten mittels eines Einzelkolonieausstrichs ausplattiert. Die Kultivierung von *E. coli* DH5α und BL21(DE3) erfolgt bei 37 °C entweder in LB-Medium oder auf LB-Platten. Zur Selektion von Transformanten werden Antibiotika hinzugegeben. Ampicillin wird in einer Endkonzentration von 100 µg/mL eingesetzt.

Bestimmung des Bakterientiters

Der Bakterientiter wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Als Referenz dient das eingesetzte Nährmedium. Bei *E. coli* entspricht eine OD₆₀₀ = 0.1 einer Zellzahl von ca. 2·10⁷.

Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5α- oder BL21(DE3) Zellen nach der CaCl₂ Methode werden 500 mL vorgewärmtes LB-Medium mit 5 mL einer Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien werden bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.4 kultiviert. Dann werden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4000 x g und 4 °C, 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 125 mL einer kalten, MgCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert und weitere 5 min auf Eis gekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4000 x g, 4 °C, 10 min) wird das Pellet in 25 mL einer kalten, CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert und 20 min auf Eis gekühlt. Die Zellen werden durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 4000 x g pelletiert. Abschließend wird das Pellet in 5 mL eiskalter CaCl₂-Lösung (100mM) mit 15 % Glycerin (v/v) resuspendiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.^[164] Für die Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* DH5α- oder BL21(DE3) Zellen werden 500 mL vorgewärmtes LB-Medium mit 5 mL einer Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien werden bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.3

kultiviert. Dann wird der Kolben auf 4 °C abgekühlt und die Zellen bei 4000 x g, 4 °C, 10 min pelletiert. Das Pellet wird in 500 mL kaltem Wasser resuspendiert. Dieser Schritt wird mehrmals wiederholt. Das Pellet wird schrittweise erst in 250 mL kaltem Wasser, dann in 10 mL 10 % Glycerin und anschließend in 2 mL 10 % Glycerin resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung werden die Zellen bei -80 °C gelagert.

Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen mit Plasmid DNA

Für die Transformation von 50 µL chemisch kompetenten *E. coli* DH5α- oder BL21(DE3) Zellen werden 50 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgt ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C woraufhin die Zellen weitere 5 min auf Eis inkubiert werden. Die Zellen werden dann mit 250 µL warmen LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 40 min inkubiert. Abschließend werden 100-150 µL des Ansatzes auf eine LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

Auch durch Elektroporation kann DNA in Bakterienzellen eingeschleust werden. Hierfür werden die Zellen kurzen, elektrischen Pulsen ausgesetzt, wodurch sich Poren in der Plasmamembran bilden, durch die die DNA in die Zelle eindringen kann. Für die Elektroporation werden 40 µL elektrisch kompetenter *E. coli* DH5α- oder BL21(DE3) Zellen auf Eis aufgetaut und mit 50 ng der Plasmid-DNA versetzt. Die Zellen werden in einer Elektroporationsküvette bei 1800 V elektroporiert und anschließend umgehend in 500 µL SOC-Medium aufgenommen. Der Ansatz wird 30 min bei 37 °C inkubiert und abschließend auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

Kryokonservierung von *E. coli*-Kulturen

Die Lagerung von transformierten *E. coli* DH5α- oder BL21(DE3) Zellen erfolgt durch Glycerinkulturen bei -80 °C. Dazu wird von einer Übernachtskultur 0.5 mL entnommen, mit 0.5 mL Glycerin (87 %) vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in präparativen Mengen wurde das QIAPREP ISOLATION MIDI KIT (QIAGEN) verwendet. Dazu wird ein Einzel-Klon in 100 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wird bei 16 000 x g für 1 min pelletiert und die Plasmid-DNA anschließend nach Herstellerprotokoll des Kits aus den Zellen extrahiert.

Anzucht von *E. coli* zur Produktion von mtbFGE

Eine Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3) transformiert mit pet14b-mtb-FGE-His₆ wird 1 zu 200 mit LB-Medium verdünnt. Für die Selektion wird Ampicillin (100 mg/L) eingesetzt. Die Kultur wird bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.6 in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt bei 18 °C mit IPTG (200 µM). Darauf folgt die Inkubation für 16-24 h bei 18 °C. Die Zellen werden zum Ernten bei 8200 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Abschließend wird das Pellet mit PBS gewaschen. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

5.2.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Auftauen von eukaryotischen Zellen

Die kryokonservierten Zellen werden bei 37 °C aufgetaut und direkt bei 250 x g für 6 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird in 5 mL vorgewärmten Medium resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in einer T25-Flasche ausplattiert. Nach 24 h wird das Medium gewechselt. Sobald eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht ist erfolgt die erste Passage.

Kultivierung von KB-3-1, A431 und MCF7 Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden KB-3-1, A431 und MCF7 Zellen erfolgt in T25 bzw. in T75-Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 99 %. Als Nährmedium für KB-3-1 und A431 Zellen wird DMEM mit 10 % FKS und 4.5 g/L Glukose eingesetzt. Für die Kultivierung der MCF7 Zellen wird RPMI-Medium mit 10 % FKS verwendet. Alle Arbeitsschritte werden steril durchgeführt. Die Zellen werden im Abstand von zwei bis drei Tagen und beim Erreichen einer Konfluenz von 90-100 % passagiert. Hierfür wird das Medium abgesaugt und durch 5-10 mL Trypsin/EDTA-Lösung (0.05 % Trypsin, 0.02 % EDTA, in PBS) ersetzt und bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen werden in 5-10 mL Medium suspendiert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 250 x g für 6 min pelletiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen werden in 10 ml Medium resuspendiert. Je nach Konfluenz der Zellkultur wird die Suspension verdünnt und mit Medium auf ein Volumen von 8 mL bzw. 20 mL für die weitere Kultivierung aufgefüllt.

Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Zur Kryokonservierung von adhärent wachsenden Zellen wird das Medium in einer T75-Zellkulturflasche abgesaugt und durch 10 mL Trypsin/EDTA-Lösung (0.05 % Trypsin, 0.02 % EDTA, in PBS) ersetzt. Dann werden die Zellen für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen werden in 10 mL Medium suspendiert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 250 x g für 6 min pelletiert. Das Pellet wird in 5 mL vorgekühltem, Medium mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und Aliquots von 1 mL werden in Kryoröhrchen mit Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgt in Flüssigstickstoff oder bei -150 °C.

5.2.4 Kultivierung von Insektenzellen

Auftauen von Insektenzellen

Die kryokonservierten SF9- oder *High Five*-Insektenzellen werden bei 27 °C aufgetaut und direkt in einer T25-Zellkulturflasche mit 5 mL Medium verdünnt. Für die Sf9-Zellen wird SF900 III SFM-MEDIUM und für die *High Five*-Zellen EXPRESSFIVE-MEDIUM mit 2 mM Glutamin verwendet. Nach 1 h Inkubation bei 27 °C wird das Medium der adhären Zellen gewechselt. Die Zellen erreichen in ein bis zwei Tagen eine Konfluenz von 90-100 %. Durch Scherkräfte werden die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst, in T75-Zellkulturflaschen transferiert und mit 15 mL Medium verdünnt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-100 % erfolgt die weitere Kultivierung in Suspension. Die minimale Zellzahl in Suspension sollte bei $3 \cdot 10^5$ Zellen/mL liegen.

Kultivierung von Sf9- und *High Five*-Insektenzellen in Suspensionskultur

Die Kultivierung von Sf9- und *High Five*-Insektenzellen wird in sterilen Erlenmeyerkolben im Orbitalschüttler bei 180 rpm und 27 °C durchgeführt. Für die Sf9-Zellen wird Sf900 III SFM-MEDIUM und für die *High Five*-Zellen EXPRESSFIVE-MEDIUM mit 2 mM Glutamin verwendet. Alle 2-3 Tage oder beim Erreichen einer Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL werden die Kulturen mit Medium auf ca. $3 \cdot 10^5$ (*High Five*) bzw. $7 \cdot 10^5$ (*Sf9*) Zellen/mL verdünnt. Hierfür wird die Suspensionskultur bei 100 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in der entsprechenden Menge Medium resuspendiert. Die Viabilität sowie die Anzahl an Zellen wird über eine Trypanblau-Färbung mit Hilfe eines Zellzählgerätes bestimmt.

Produktion und Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Für die Produktion rekombinanter Baculoviren und für die Generierung hoher Virustiter werden Sf9-Zellen verwendet. Die Transfektion der Sf9-Zellen erfolgt in adhärenter Kultur, mit Hilfe des BACMAGIC-DNA-KITS entsprechend dem Herstellerprotokoll von Novagen. Es wird der Vektor pAcGP67-B-ALKa- Δ 72FGE-His₇, für die Transfektion eingesetzt. Nach 5 tägiger Inkubation wird das Medium, welches die rekombinanten Baculoviren der ersten Generation enthält geerntet und direkt für eine Virusamplifikation in Sf9-Zellen verwendet. Hierfür werden 100 mL einer Sf9-Suspensionskultur mit einer Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit 0.5 mL des rekombinanten Virus angeimpft und für 5 Tage im Orbitalschüttler bei 180 rpm und 27 °C kultiviert. Abschließend wird die Kultur bei 1000 x g für 20 min pelletiert. Der Überstand mit dem rekombinanten Virus der zweiten Generation wird schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Plaque-Assay zur Bestimmung des Virustiters

Der Titer der zweiten Virusgeneration wird mit einem Plaque-Assay bestimmt. Es werden Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von $7 \cdot 10^5$ Zellen/mL und einer Viabilität von über 95 % in einer 6 cm Zellkulturplatte bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Das Medium der adhärenen Zellen wird abgenommen und durch eine Verdünnungsreihe (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) der rekombinanten Viren in Medium ersetzt. Die Bestimmung erfolgt in Triplets einschließlich einer Negativkontrolle. Die Zellkulturplatten werden für 1 h bei 27 °C mit dem Virus inkubiert. Dann wird der Überstand entfernt und die Zellen mit 3 mL einer Agarose-Lösung (1 % Agarose in H₂O/Medium) versiegelt. Nach dem Aushärten der Agarose werden 3 mL Medium auf die Platten gegeben, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Nach einer Inkubation bei 27 °C 7 Tage erfolgt die Färbung mit Neutralrot. Der Farbstoff wird von lebende Zellen aufgenommen, Viruspartikel führen somit zu farblosen Plaques auf der Platte, da die umliegenden Zellen infiziert und lysiert werden. Es werden 1.5 mL Neutralrot (0.03 % in PBS) zu den Platten geben und es erfolgt eine Inkubation für 2 h bei 27 °C. Nach entfernen der Färbelösung werden die Zellkulturplatten über Nacht bei 4 °C gelagert und abschließend die Plaques gezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung kann die Anzahl der *plaque forming units* (pfu) berechnet werden.

Expression von $\Delta 72$ FGE in *High Five*-Insektenzellen

Für die Proteinexpression werden *High Five*-Zellen verwendet. Die Sekretionsleistung dieser Zelllinie ist im Vergleich zu *SF9*-Zellen 5-10 fach höher.^[165] Das Zielprotein kann direkt aus dem Kulturmedium angereichert werden. Die Expression von $\Delta 72$ FGE in *High Five*-Zellen erfolgt in einem Volumen von 100-300 mL Suspensionskultur, mit einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL. Die Viabilität der Kultur sollte über 90 % liegen. Für die Infektion werden 1.5 pfu/Zelle eingesetzt und die Proteinexpression erfolgt für vier Tage im Orbitalschüttler bei 180 rpm und 27 °C. Anschließend werden die Zellkulturüberstände durch Zentrifugation (10 000 x g, 4 °C, 10 min) geerntet.

5.2.5 Biochemische Methoden

Zellyse durch French Press

Die *E. coli* Zellpellets aus 1 L Kulturvolumen werden in 35 mL PBS resuspendiert und mit Proteaseinhibitor (COMPLETE, ROCHE) sowie DNAase versetzt. Der Aufschluss erfolgt in einer Druckzelle bei 1000 psi und wird dreimal wiederholt.

Zellyse durch Ultraschall

E. coli Zellpellets aus <100 mL Kulturvolumen werden in 100-200 μ L PBS mit Proteaseinhibitor-Cocktail (1:100) resuspendiert und im Ultraschall-Bad bei 4 °C, fünfmal jeweils 30 s beschallt.

Anreicherung mittels IMAC-Affinitätschromatographie

Die IMAC-Affinitätschromatographie basiert auf der Komplexbildung zwischen den auf der Säulenmatrix immobilisierten Metallkationen und dem Imidazolring von Histidin. Häufig werden Ni^{2+} oder Co^{2+} Kationen eingesetzt, die durch eine Aminosäuresequenz von sechs Histidin-Resten komplexiert werden. Mit Hilfe dieser Technik können Proteine angereichert werden. Nach einem Waschschritt wird das Protein durch Zugabe von Imidazol eluiert. Imidazol ist ein zum Histidin kompetitiver Ligand. Durch die deutlich höhere Konzentration an Imidazol wird der His6-tag aus der Koordinationssphäre der Metallkationen verdrängt.

Das Zellysats aus der Lyse mittels French Press (mtbFGE) oder das Medium der Insektenzellkultur nach Dialyse (Δ FGE) wird bei 16 000 x g für 30 min zentrifugiert und der Überstand mit einem 0.2 μ m Sterilfilter von unlöslichen Bestandteilen befreit. Die Anreicherung von mtbFGE und Δ FGE erfolgt über Ni^{2+} -Affinitätschromatographie an der ÄKTA EXPLORER. Als stationäre Phase wird eine HISTRAPHP 1 mL Säule verwendet. Die Äquilibrierung der Säule erfolgt mit 5 mL Bindepuffer, 5 mL Elutionspuffer und weiteren 5 mL Bindepuffer. Dann wird über den Superloop die Probe injiziert. Vor der Elution des Zielproteins wird die Säule mit 15 mL Bindepuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine abzutrennen. Dann erfolgt ein linearer Imidazol-Gradient (0-100 %) im Laufe von 20 CV von 5 bis 250 mM Imidazol (mtbFGE) oder 0-500 mM Imidazol (Δ FGE). Dabei werden Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 1 mL gesammelt.

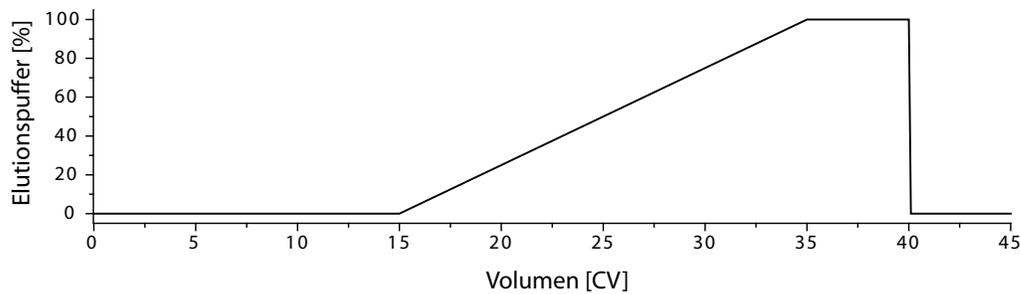


Abbildung 5-2: Gradient für die IMAC-Affinitätschromatographie. Gezeigt ist die Konzentration an Elutionspuffer in Prozent im Verlauf der Anreicherung. Der Elutionspuffer enthält 250 mM Imidazol (mtbFGE) oder 500 mM Imidazol (Δ FGE).

Alternativ erfolgt die IMAC im *batch* Verfahren. Δ 72FGE wird in *High Five*-Insektenzellen unter Suspensionsbedingungen exprimiert. Es werden 300 mL des serumfreien Mediums direkt nach der Ernte für die Aufreinigung eingesetzt. Hierfür werden 3 mL Ni²⁺-Sepharose zum Δ 72FGE -haltigen Medium hinzugegeben und für 4 h bei 4 °C inkubiert. Durch Zentrifugation mit 1000 x g für 3 Minuten wird die Ni²⁺-Sepharose vom Überstand abgetrennt und im Folgenden viermal mit je 20 mL Waschpuffer (5 mM Imidazol) gewaschen. Daraufhin folgt ein Waschschrift mit 10 mM Imidazol. Die Elution wird viermal mit 2 mL Elutionspuffer durchgeführt, der 250 mM Imidazol enthält.

Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (SEC) erfolgt die Trennung aufgrund der Größe der Proteine. Moleküle, die klein genug sind, dringen in die Poren der stationären Phase ein, wodurch die Elution verzögert wird. Große Moleküle dringen nicht in die Poren ein und werden am schnellsten eluiert.

Mit Hilfe der SEC werden Verunreinigungen von FGE getrennt, die nicht durch die IMAC abgereichert werden können. Weiterhin wird untersucht, ob FGE in monomerer oder multimerer Form vorliegt. Für die Größenausschlusschromatographie wird ein System verwendet, welches Proteine, Peptide und andere Moleküle im Bereich von 10-600 kDa mit guter Auflösung separiert (SUPERDEX SD200GL, ETTAN-HPLC-SYSTEM – GE HEALTHCARE) oder welches für die Trennung von Proteinen zwischen 3 kDa und 70 kDa ausgelegt ist oder (SUPERDEX 75 10/300GL, ETTAN-HPLC-SYSTEM – GE HEALTHCARE)

Die Chromatographie wird mit einem isokratischen Gradienten des jeweiligen Puffers durchgeführt. Die Flussgeschwindigkeit beträgt 300 μ L/min und die Fraktionsgröße 500 μ L.

Ionenaustauschchromatographie

Eine Anreicherung verschiedener Proteinkomponenten kann aufgrund der unterschiedlichen Nettoladungen der Proteine bei verschiedenen pH-Werten durch Ionenaustauschchromatographie (IAC) erfolgen. Die Proteine binden über elektrostatische Wechselwirkungen an die stationäre Phase der Säule. Damit diese Bindung ausreichend ist, muss der pH-Wert des eingesetzten Puffers um mindestens

eine Einheit vom isoelektrischen Punkt des Zielproteins abweichen. Die Elution erfolgt durch die Erhöhung der Ionenstärke in der mobilen Phase. Für die IAC von FGE wird aufgrund der guten Stabilität des Proteins im basischen eine Anionenaustauschchromatographie (AEC) durchgeführt. Der isoelektrische Punkt von $\Delta 72\text{FGE-His}_7$ liegt bei $\text{pI} = 6.39$ und von mtbFGE-His_6 bei 6.57. Daher wird ein Puffer mit einem pH-Wert von 8 eingesetzt. Als stationäre Phase wird eine RESOURCEQ 1 mL Säule verwendet. Die Äquilibration der Säule erfolgt mit 5 mL Bindepuffer. Vor dem Beladen der Säule wird das Zielprotein mit Bindepuffer verdünnt, um die Salzkonzentration zu senken. Vor der Elution wird die Säule mit 10 mL Bindepuffer gewaschen. Dann erfolgt ein linearer NaCl-Gradient (0-100 %) im Laufe von 20 CV. Der Elutionspuffer enthält 1 M NaCl. Dabei werden Fraktionen mit einem Volumen von 1 mL gesammelt.

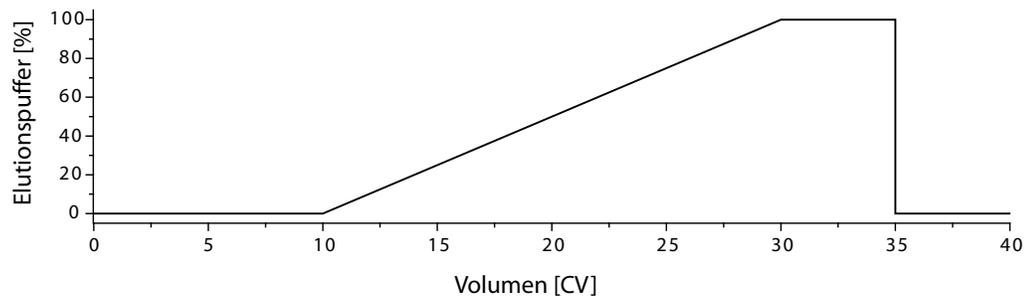


Abbildung 5-3: Gradient für die AEC. Gezeigt ist die Konzentration an Elutionspuffer in Prozent im Verlauf der Anreicherung. Der Elutionspuffer enthält 1 M NaCl.

Aufkonzentrieren und Umpuffern mit Zentrifugationskonzentratoren

Mit Hilfe von Konzentratoren werden Proteine aufkonzentriert oder der Puffer gewechselt. Hierfür werden die Zentrifugationskonzentratoren zuerst mit Zielpuffer aktiviert. Damit Flüssigkeiten durch die Membran gelangt, wird mit 5000 x g zentrifugiert. Anschließend wird die Proteinprobe auf die Membran gegeben und je nach Folgeanwendung durch Zentrifugieren bei 5000 x g eingengt oder in einen anderen Puffer überführt.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird ein Bradford-Assay durchgeführt. Der im Reagenz enthaltene Farbstoff bindet bevorzugt an aromatische Aminosäuren, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt.^[166] Für die Konzentrationsbestimmung werden 10 μL der Probe in Dreifachbestimmung vermessen. Bei Bedarf wird die Probe verdünnt, damit die Extinktion unter $E=1$ liegt. In einer 96-well Platte werden 200 μL Bradford-Reagenz hinzugefügt und nach Mischen für 10 min bei RT inkubiert. Die Absorptionmessung erfolgt bei 595 nm. Die Proteinkonzentration wird mit Hilfe einer Eichgerade bestimmt. Für die Eichgerade werden 10 μL der BSA-Standards mit den Konzentrationen von 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.025, 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ verwendet.

Bestimmung der Proteinkonzentration durch Densitometrie

Die Densitometrie ist die quantitative Messung der Farbdichte pro Flächeneinheit. Dabei werden Tonwerte des RGB-Farbkanals, aber keine Farbtöne, bestimmt. Mit dieser Technik ist bei separierten Banden eine relativ genaue Messung möglich. Bei Lysaten besteht jedoch das Problem, dass sich Banden überlagern können. Die densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit der Software ImageJ durchgeführt, indem die Tonwerte je einer Spur gegen die Ortskoordinate aufgetragen wurden. Der Flächeninhalt der Peaks ist proportional zur Proteinkonzentration. Bei der Integration wurde der Hintergrund durch eine Korrektur der Basislinie subtrahiert. Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe von BSA-Standards berechnet werden. Es werden Standards mit 1 µg, 2 µg und 3 µg BSA aufgetragen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Das im Gel und Lämmli-Puffer enthaltene anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die Proteine und maskiert ihre Eigenladung. Die Proteine erhalten eine konstant negative Ladung, wodurch diese, nach Anlegen einer elektrischen Spannung, in Richtung der Anode wandern. Die Auftrennung der Proteine wird dabei von der Porengröße des Polyacrylamidgels bestimmt. Das Polyacrylamidgel entsteht durch radikalische Copolymerisation von Acrylamid und Methylenbisacrylamid.

Vor der Elektrophorese werden die Proben in Lämmli-Puffer mit SDS und optional β -Mercaptoethanol 5 min bei 95 °C aufgeköcht, wodurch die Sekundär- und Tertiärstrukturen denaturiert werden. Durch β -Mercaptoethanol werden zudem alle Disulfidbrücken reduziert. Für die Auftrennung der Proteinproben werden 1 mm oder 1.5 mm dicke Polyacrylamidgele eingesetzt. Es wird ein ca. 1 cm breites 5 %iges Sammelgel verwendet. Als Trenngel werden 10 %ige bis 15 %ige Polyacrylamidgele benutzt. Die Laufkammer wird mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgt bei 10-25 mA über ca. 4 h.

Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die aufgetrennten Proteine werden durch kolloidale Coomassie-Färbung mittels den an basische und aromatische Aminosäuren bindenden Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 im Gel sichtbar gemacht. Die Nachweisgrenze beträgt ca. 30 ng.^[162] Nach der Elektrophorese werden die Proteinbanden im Gel durch Schwenken in Fixier-Lösung für 60 min fixiert. Das Gel wird anschließend in Färbelösung überführt und über Nacht gefärbt. Der unspezifische Hintergrund wird durch Waschen in Fixier-Lösung dann durch Waschen in H₂O entfernt.

Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Auch durch eine Silberfärbung können Proteinbanden im Gel gefärbt werden. Dabei bilden Ag⁺-Kationen Komplexe mit Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cysteinen. Nach der Komplexbildung erfolgt eine Reduktion mit Formaldehyd zu elementarem Silber.^[167]

Für die Fixierung der Proteine wird das Polyacrylamidgel für 1 h bei RT in Fixierlösung inkubiert. Dann wird das Gel 3 x mit Ethanol/dH₂O (30 % v/v) und 1 x mit

dH₂O gewaschen. Die Sensitivierung erfolgt in einer Na₂S₂O₃-Lösung (0.02 % w/v dH₂O) für 1-2 Minuten. Nach drei Waschschrritten mit dH₂O wird das Polyacrylamidgel mit einer AgNO₃-Lösung (0.2 % w/v dH₂O) bei 4 °C 20 Minuten inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit dH₂O wird das Gel in einer neuen Glasschale mit Entwicklerlösung (0.05 % v/v Formaldehyd, 3 % Na₂CO₃ v/w in dH₂O) geschwenkt, bis der gewünschte Kontrast erreicht ist. Die Reaktion wird durch Waschen mit dH₂O und Inkubation in einer Essigsäure-Lösung (5 % v/v) abgestoppt.

Western Blot (*semy-dry*) und Immundetektion

Nach der Auftrennung des Proteingemisches durch SDS-PAGE erfolgt der spezifische Nachweis bestimmter Proteine über einen *Western Blot*. Hierbei wird die Bindung zwischen Antikörper und Antigen ausgenutzt. Für diese Immundetektion müssen die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Zunächst werden zwei Lagen Whatman-Papier in Kathodenpuffer äquilibriert, das Gel wird auf dem oberen Whatman-Papier positioniert. Die PVDF-Membran wird vorher in Methanol aktiviert, anschließend in Kathodenpuffergeschwenkt und abschließend blasenfrei auf das Gel gelegt. Zwei weitere Lagen Whatman-Papier werden in Anodenpuffer äquilibriert und auf der PVDF-Membran platziert. Für den Transfer wird eine elektrische Spannung von 1 mA/cm² PVDF-Membran für 60 min angelegt. Die Membran wird anschließend bei RT für 1 h in 5 % Milchpulver in PBS geschwenkt. Dieser Schritt dient der Blockierung unbesetzter Proteinbindestellen auf der PVDF-Membran. Über Nacht wird die Membran bei 4 °C mit dem primären Antikörper unter Schütteln inkubiert. Dann wird die Membran 2 x für 10 min mit PBS-T und 1 x für 10 min mit PBS gewaschen. Die Membran wird mit dem sekundären Antikörper für 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Dieser Antikörper ist mit der Meerrettich-Peroxidase gekuppelt und bindet spezifisch den FC-Teil des Primärantikörpers. Abschließend wird 2 x mit PBS-T für 10 min und 1 x mit PBS für 10 min gewaschen. Im Anschluss wird die Membran mit einer ECL-Lösung behandelt. Diese Lösung besteht aus Luminol und Wasserstoffperoxid. Die Meerrettich-Peroxidase am sekundären Antikörper oxidiert in Gegenwart von H₂O₂ das Luminol, wodurch Chemilumineszenz entsteht. Die Detektion erfolgt mit einer ECL-Kamera.

Stripping von Western Blots

Zum Entfernen von Antikörper-Konjugaten wird die PVDF-Membran im Anschluss an die Entwicklung für 5 min in PBS-T gewaschen und anschließend 1 h bei RT in der *Stripping*-Lösung inkubiert. Die Membran wird dann 5 x mit H₂O gewaschen und 30 min in 1 M Tris-Puffer pH 8.8 inkubiert. Die Membran wird erneut 5 x mit H₂O und 1 x mit PBS-T gewaschen. Abschließend kann die PVDF-Membran wieder geblockt und mit einem anderen Antikörper entwickelt werden.

Tryptischer Verdau

Für die Identifizierung von Proteinen aus Gelbanden wird ein tryptischer Verdau durchgeführt. Trypsin ist eine Serin-Protease und spaltet Proteine und Peptide nach Lysin- und Arginin-Resten. Die Coomassie-gefärbten Proteinspots werden aus dem Gel geschnitten und in 1 mm³ große Stücke zerteilt. Die einzelnen Proben werden jeweils mit 500 µL ACN/H₂O (1:1) (5 min), ACN/50 mM NH₄HCO₃ (1:1) (30 min) und ACN/10 mM NH₄HCO₃ (1:1) (120 min) gewaschen. Wenn eine der Proben nach diesen

Waschschritten weiterhin blau gefärbt ist, wird erneut mit 500 μL ACN/10 mM NH_4HCO_3 gewaschen. Die Gelstücke werden im Anschluss in der SpeedVac 30 min getrocknet. Für den tryptischen Verdau wird pro Probe 0.1 μg Trypsin auf die getrockneten Gelstücke gegeben. Anschließend werden 30 μL 10 mM NH_4HCO_3 zugegeben und der Ansatz wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Gelstücke werden in der SpeedVac 30 min getrocknet und dann in 10-20 μL ACN/ H_2O (1:1) 0.1 % TFA aufgenommen. Die Proben werden für 30 min geschüttelt und anschließend bei -20 °C gelagert.

Identifizierung der Proteine aus Gelbanden mittels MALDI-ToF-MS

Die Proben des tryptischen Verdau der Proteine aus Gelbanden werden im ULTRAFLEX^{TREME} MALDI-ToF-MS/MS in positivem Reflektormodus (400-4500 m/z) mit 5000 Schüssen pro MS-Spektrum vermessen. Die Ergebnisse werden mit einer *Mascot* Datenbank für Bakterien bzw. für humane Proteine (CEBiTEC) verglichen. Dabei werden Abweichungen der einzelnen Fragmente von maximal 100 ppm erlaubt. Bei der Datenbanksuche wird ein Trypsin-Fehlschnitt mit einbezogen. Anhand des berechneten *Mascot-Scores* eines Proteins kann die Validität des Ergebnisses beurteilt werden. In den Score fließen die Abweichungen der Peptidmassen von denen der Datenbank, die Anzahl der erlaubten Fehlschnitte im Trypsinverdau sowie die Sequenz-Abdeckung der Peptide mit dem Protein ein.^[168]

Linear-MALDI-ToF-MS von Proteinen

Im Vergleich zu MALDI-ToF-MS Messungen im Reflektor-Modus können im Linear-Modus ohne Einsatz des Reflektors Proteine in einem höheren Massenbereich detektiert werden. Der Nachteil dieser Methode ist eine geringere Massengenauigkeit und Auflösung.

Für die Messung werden Proteine in eine Sinapinsäure-Matrix eingebettet, indem zunächst 0.5 μL einer gesättigten Lösung von Sinapinsäure in Ethanol auf ein *Ground-Steel-Target* aufgetragen werden. Nach dem Trocknen wird 1 μL einer Mischung bestehend aus gleichen Teilen der zu analysierenden Proteinlösung und einer gesättigten Lösung von Sinapinsäure in TA30 auf die gleiche Position gegeben. Die Messung erfolgt im Linear-Positiv-Modus mit 10 000 Schüssen pro MS-Spektrum in einem Massenbereich von 10 - 120 kDa. Die Kalibrierung des ULTRAFLEX^{TREME} MALDI-ToF-MS Spektrometers erfolgt mit Hilfe eines Größenstandards.

Konformationsanalyse von mtbFGE und $\Delta 72\text{FGE}$

Um zu analysieren, ob mtbFGE wie $\Delta 72\text{FGE}$ mehrere Konformationen besitzt, wird es mit Thiolgruppen-modifizierenden Reagenzien behandelt und per Western Blot auf die Anwesenheit verschiedener Konformationen untersucht. Als Reagenz wird für die Reduktion von Disulfiden, Dithiothreitol (DTT) und für die Alkylierung Iodoacetamid verwendet. Die Konformationsanalyse wird mit mtbFGE aus den vereinigten Fraktionen der IMAC durchgeführt. Je 180 ng gereinigtes Enzym werden pro Probe eingesetzt. Zuerst wird Mtb-FGE mit Puffer (MTGC-Puffer mit den pH-Werten 7, 9, 11) auf eine Konzentration von 30 ng/ μL verdünnt. Weiterhin werden die Stammlösungen der Reagenzien in Puffer angesetzt. Es werden je vier Proben vorbereitet. Zwei Kontrollansätze, die nicht mit DTT oder IAM behandelt wurden, werden durch SDS-

PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Eine Probe wird zunächst 10 min bei 37 °C inkubiert und dann mit IAM (10 mM) versetzt und erneut 10 min bei 37 °C inkubiert. Der vierte Ansatz wird zunächst mit DTT (2 mM) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert, dann wird IAM (10 mM) zugesetzt und nochmals 10 min bei 37 °C inkubiert. Beide Ansätze werden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels einer SDS-PAGE analysiert.

Bestimmung der Peptidkonzentration nach Scopes

Die Konzentration der Peptide die für FGE-Aktivitätstests verwendet werden wird nach der exakten Einwaage und Verdünnungsreihe durch die Scopes-Methode kontrolliert. Hierfür wird die Absorption bei einer Wellenlänge $\lambda = 205$ nm gemessen, bei der vorwiegend die π -Elektronen der Peptidbindung absorbieren. Die Berechnung der Peptidkonzentration erfolgt über das Lambert-Beer-Gesetz. Der Extinktionskoeffizient für eine Peptidlösung (0.1 % in dH₂O) bei $\lambda = 205$ nm beträgt nach Scopes $\epsilon_{0.1} = 31$.^[169] Der Faktor 10 in Gleichung (3) dient der Anpassung der Schichtdicke des NANODROP 2000.

$$\frac{A_{205}}{\epsilon_{0.1}} \times 10 = c \text{ [mg / mL]} \quad (3)$$

In vitro FGE-Aktivitätstest mittels MALDI-ToF-MS

Der in dieser Arbeit angewandte Assay zur Bestimmung der Aktivität von FGE basiert auf dem von Peng *et al.* entwickelten Aktivitätsassay für humanes FGE.^[149] Die Aktivität von gereinigtem FGE wird mit Hilfe von Substratpeptiden untersucht. Als Kontrolle dient das Peptid **CS1** aus der humanen Arylsulfatase A (AS 60-80) mit der Sequenz Ac-MTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRS-NH₂. Die FGE-vermittelte Oxidation des Cystein-Rests zu Formylglycin resultiert in einer Reduktion der monoisotopischen Masse um 18.01 Da von 2526.28 Da ([M+H]⁺) auf 2508.29 Da ([M+H]⁺). Der Reaktionsverlauf kann daher massenspektrometrisch über MALDI-ToF-MS detektiert werden. Die Intensitäten der monoisotopischen Signale des Eduktes und des Produktes werden zur Ermittlung des Substratumsatzes verwendet.

Pro Ansatz werden 16-32 pmol Peptid durch 10 bis 20 ng FGE in 30 μ L Reaktionslösung umgesetzt. Die Proben werden auf Eis vorbereitet und der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe des Peptids. Die Proben werden für 20 min bei 37 °C und 1100 rpm im Thermomixer inkubiert. Dann wird die Reaktion mit 3.5 μ L 20 %iger TFA-Lösung auf Eis abgestoppt. Anschließend wird der Reaktionsansatz durch ZIP TIP C18 Spitzen (MILLIPORE) gereinigt und mittels MALDI-ToF-MS analysiert. Nach Bestimmung des Umsatzes nach Formel (4) lässt sich die Spezifische Aktivität berechnen (5).

$$\text{Umsatz [\%]} = \frac{\text{Intensität FGly}}{\text{Intensität FGly} + \text{Intensität Cys}} \quad (4)$$

$$\text{spez. Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] = \frac{n(\text{FGly}) [\mu\text{mol}]}{\text{Inkubationszeit [min]} \cdot m(\text{FGE}) [\text{mg}]} \quad (5)$$

Reinigung der Aktivitätstest-Proben

Die Aktivitätstest-Proben werden mittels ZIPTIP C18-Säulen gereinigt. Die ZipTip-Spitzen werden zunächst fünfmal mit je 10 µL TA50 (50:50 v/v Acetonitril:dH₂O, 0.1 % TFA) und daraufhin fünfmal mit je 10 µL TA0 (0.1 % TFA in dH₂O) äquilibriert. Das Peptid wird danach durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren an die Säulen gebunden, erneut mit je 10 µL TA0 gewaschen. Abschließend 10 mal in 10 µL TA50 eluiert. Die so präparierten Proben werden direkt mittels MALDI-ToF-MS unter Verwendung einer HCCA- oder 2,4-DNPH-Matrix analysiert.

Identifizierung von FGly in Peptiden

Der Nachweis von FGly innerhalb einer Peptidsequenz erfolgt durch MALDI-ToF-MS Messungen. Durch die Oxidation von Cystein durch FGE zu FGly kann ein Massenshift von 18.01 Da detektiert werden. Bei der Umsetzung von Serin zu FGly beträgt der Massenshift 2.01 Da. Für die Messung wird einerseits eine α -Cyanohydroxymizsäure Matrix (HCCA) verwendet. Weiterhin kann durch die Verwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) als Matrix eine selektive Derivatisierung der Aldehydfunktion zum Dinitrophenylhydrazon erzeugt werden. Hierdurch erhöht sich das Molekulargewicht der FGly-modifizierten Peptide um 180.13 Da.^[170]

In vitro FGE-Aktivitätstest mittels RP-HPLC

Für die Bestimmung der Aktivität von FGE wird neben dem MALDI-ToF-MS Assay ebenfalls die analytische Umkehrphasen-HPLC eingesetzt. Das System besteht aus dem PDA-Detektor (Diodenarray), dem Autosampler (ACCELA) und einer Pumpe (ACCELA 600). Die Anlage ist mit der Säule HYPERSIL GOLD, 3 µM, 150 x 2.1 mm (THERMO SCIENTIFIC) ausgestattet. Als mobile Phase wird eine Mischung aus Eluent A (H₂O/ACN/TFA, 95:5:0.1) und Eluent B (H₂O/ACN/TFA, 5:95:0.1) eingesetzt. Die Flussrate beträgt 0.7 mL/min. Für diese Methode ist es essentiell, dass die zu analysierenden Peptide eine unterschiedliche Hydrophobizität aufweisen. Das Produkt der Oxidation mittels FGE, das Aldehyd-Peptid ist hydrophiler als das Edukt Cystein-Peptid. Beide Peptide können mit der folgenden Methode, die in Abbildung 5-4 gezeigt wird, separiert werden.

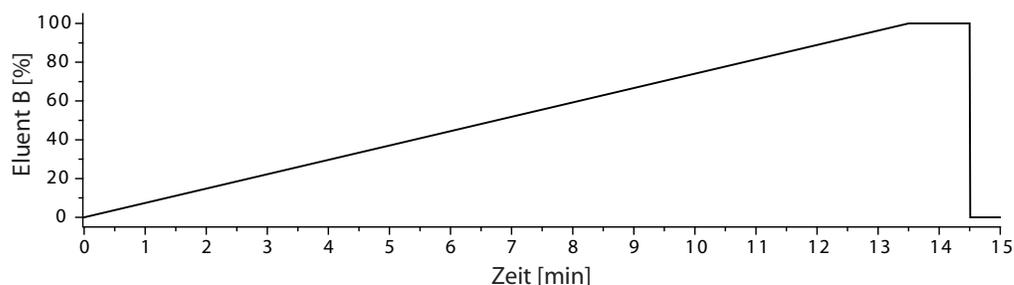


Abbildung 5-4: Gradient für den FGE Aktivitätstest mittels RP-HPLC. Gezeigt ist die Konzentration an Eluent B in Prozent.

Alle verwendeten Peptide enthalten mindestens eine aromatische Aminosäure, daher erfolgt die Integration der Signale für Edukt und Produkt bei einer Wellenlänge von

280 nm. Pro Reaktionsansatz werden 300 µg Peptid mit 50 bis 100 µg FGE in 900 µL Reaktionslösung umgesetzt. Dieser Assay wird mit verschiedenen Puffern, bei verschiedenen pH-Werten und mit wechselnden Reduktionsmitteln durchgeführt. Die Reduktionsmittel Stammlösungen werden in jeweils verwendeten Puffer angesetzt. Die Proben werden für bis zu 24 h bei 37 °C und 1100 rpm im Thermomixer inkubiert. Aus der Reaktionslösung werden zu verschiedenen Zeiten je 60 µL Probe entnommen und mit 10 µL 20 %iger TFA-Lösung auf Eis abgestoppt. Diese Proben können bei -20 °C gelagert werden. Vor der Analyse mittels RP-HPLC werden die Proben bei 16 000 x g für 10 min zentrifugiert. Vom Überstand werden 60 µL in den *Loop* geladen. Von dieser Probe werden 20 µL auf die Säule injiziert. Durch Formel (6) lässt sich der Umsatz in Prozent berechnen. Für Proben die im Zeitraum von 0 bis 30 Minuten entnommen werden wird nach Formel (5) die spezifische Aktivität berechnet.

$$\text{Umsatz [\%]} = \frac{\text{Integral FGly}}{\text{Integral FGly} + \text{Integral Cys}} \quad (6)$$

Kupferrekonstitution von mtbFGE

Nach der Reinigung von mtbFGE mittels IMAC wurde das Enzym durch Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 5 kDa) angereichert (1.95 µg/µL). Der Durchfluss und mtbFGE dienten für die später durchgeführten ICP-MS Messungen als Vergleichswerte. Die folgenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit T. Beuel durchgeführt.

Durch Dialyse wird mtbFGE in den Rekonstitutionspuffer (50 mM TEA, 50 mM NaCl, 200 mM Arginin, pH 7.5) überführt. Dann wird Kupfersulfat (120 µM) hinzugefügt und die Probe für 1 h bei 25 °C inkubiert. Um ungebundenes Kupfer zu entfernen wird EDTA (240 µM) hinzugegeben und der Ansatz erneut für 10 min inkubiert. Nach Wechseln des Puffers um restliches Kupfer in Lösung abzureichern (Entsalzungssäule, MIDITRAP G10) werden die Proben durch ICP-MS analysiert.

Immobilisierung von mtbFGE durch *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs)

Für die Immobilisierung mittels CLEAs wird das Enzym durch Ammoniumsulfat gefällt und infolgedessen mit Glutaraldehyd quervernetzt. Der immobilisierte Biokatalysator zeigt für viele Anwendungen eine höhere Stabilität unter Reaktionsbedingungen. Der Katalysator kann durch Filtration recycelt werden und durch die Ammoniumsulfat-fällung wird eine partielle Aufreinigung erreicht.

Für die Immobilisierung von mtbFGE durch CLEAs wird das *E. coli*-Lysat (500 mL Kulturmedium) nach der mtbFGE-Expression direkt für eine Ammoniumsulfat-Fällung (50 % (w/v)) eingesetzt. Der Ansatz wird ü. N. bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wird das Aggregat für 3 h bei 4 °C mit Glutaraldehyd (0.02 % v/v) quervernetzt. Der feste Biokatalysator wird dreimal mit Puffer (Bicin-Puffer pH 9.3, Arginin 0.2 M, DTT 3 mM) gewaschen und infolgedessen für Aktivitätstests eingesetzt. Für die Aktivitätstests wird der Puffer (Bicin-Puffer pH 9.3, Arginin 0.2 M, DTT 3 mM) mit Proteaseinhibitor (COMPLETE, ROCHE) versetzt um den proteolytischen Verdau der Substratpeptide zu verhindern.

Alternativ wird gereinigtes mtbFGE (200 µg) mit BSA (2 mg) gemischt, mit Ammoniumsulfat (50 % (w/v)) gefällt und durch Glutaraldehyd (0.02 % v/v) quervernetzt. Die CLEAs werden nach Waschen mit Puffer (Bicin-Puffer pH 9.3, Arginin 0.2 M, DTT 3 mM) für Aktivitätstests eingesetzt.

Immobilisierung von mtbFGE durch Epoxide

Um mtbFGE an einem Trägermaterial zu immobilisieren, wurde RELIZYME EP403/S (RESINDION) eingesetzt. Dieses Polymethylmethacrylat (PMMA) ist auf der Oberfläche mit Epoxiden funktionalisiert. Die Methylengruppen des Epoxids sind aufgrund der Ringspannung reaktive Elektrophile und können mit Nukleophilen unter Ringöffnung reagieren.

RELIZYME EP403/S (25 mg) wird mit mtbFGE (4 mg) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Da die Konzentration der eingesetzten Proteinlösung bekannt ist, wird abschließend mit Hilfe eines Bradford-Assays die Beladung des Harzes indirekt über die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. Der Biokatalysator wird dreimal mit Puffer (Bicin-Puffer pH 9.3, Arginin 0.2 M, DTT 3 mM) gewaschen und infolgedessen für Aktivitätstests eingesetzt.

Immobilisierung von mtbFGE durch den Aldehyd-tag

Für die Immobilisierung von mtbFGE durch den Aldehyd-tag wurde zuerst das RELIZYME HA403 PMMA (RESINDION), welches auf der Oberfläche mit Aminien funktionalisiert ist, derivatisiert. Dann erfolgte die Konjugation von FGly mit dem PMMA durch eine *trapped*-Knoevenagel Konjugation.

Das Pyrazolon **41** (21 mg, 0.041 mmol) wird in DMF (1 mL) vorgelegt, dann wird RELIZYME HA403 (600 mg), HATU (0.07 g, 0.17 mmol) und DIPEA (30 µL, 0.17 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und daraufhin mit Wasser (6 x 10 mL) gewaschen. Das Harz wird mit TCEP (0.028 g, 20 mmol) in Wasser (5 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wird für 45 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit PBS-Puffer (pH 6.3, 200 mmol Arginin, 1 % Triton) gewaschen (15 x 7.5 mL). Nach der Derivatisierung von RELIZYME HA403 erfolgt die Immobilisierung von mtbFGE-L(FGly)TPSR (1 mg) in PBS-Puffer (pH 6.3, 200 mmol Arginin, 1 % Triton) durch eine *trapped*-Knoevenagel Konjugation. Die Reaktion wird für 17 h bei 4 °C geschüttelt. Abschließend wird der Biokatalysator zehnmal mit Puffer (Bicin-Puffer pH 9.3, Arginin 0.2 M, DTT 3 mM) gewaschen und infolgedessen für Aktivitätstests eingesetzt.

Biotransformation von Antikörperfragmenten mit mtbFGE

Das Antikörperfragment scFv-425-Fc wurde von G. Falck transient in CHO-Zellen exprimiert und durch eine Protein A-Säule gereinigt. Anschließend erfolgte die Biotransformation von scFv-425-Fc (1 mg, 0.0089 µmol) mit mtbFGE (0.6 mg, 0.0178 µmol) in einem Bicin-Puffer (pH 9.3, Arginin 0.2 M, DTT 1 mM, 2 mL) für eine Stunde bei 37 °C. Durch Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 100 kDa) wurde FGly-scFv-425-Fc in PBS-Puffer (pH 6, 0.2 M Arginin) überführt und mtbFGE wurde gleichzeitig abgereichert.

HIPS-Ligation mit Antikörperfragmenten

Das Antikörperfragment FGly-scFv-425-Fc (0.3-0.5 µg/µL) wird in PBS-Puffer (pH 6, 0.2 M Arginin) für 24 h bei 4 °C mit dem HIPS-Fluorophor **59** (250 µM) inkubiert. Dann wird das Antikörperfragment HIPS-scFv-425-Fc durch Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 100 kDa) in einen PBS-Puffer (pH 7.4, 0.2 M Arginin) überführt und durch SEC (Superdex 75 10/300GL) gereinigt.

Live cell imaging

Die *live cell imaging* Experimente mit dem Antikörperfragment HIPS-scFv-425-Fc werden am CLSM (Zeiss LSM 700) durchgeführt. Die Färbung der Zellmembran wird mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff CELLMASK *deep red* durchgeführt und die Lysosomen wurden mit LYSOTRACKER *blue* sichtbar gemacht.

Die Kultivierung der adhären wachsenden A431, HeLa und MCF7 Zellen erfolgt in *Microscope Slides* (1µ-Slide, 8 Well, Glass Bottom, IBIDI) im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 99 %. Als Nährmedium für HeLa und A431 Zellen wird DMEM mit 10 % FKS und 4.5 g/L Glukose eingesetzt. Für die Kultivierung der MCF7 Zellen wird RPMI-Medium mit 10 % FKS verwendet. Die Zellen werden mit Medium gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit LYSOTRACKER *blue* (75 nM, 200 µL in Medium) bei 37 °C inkubiert. Dann wird CELLMASK *deep red* mit Medium Verdünnt (1:500, 200 µL) und ebenfalls auf die Zellen gegeben (finale Verdünnung 1:1000, 400 µL). Nach weiteren 10 Minuten bei 37 °C wird das Medium verworfen und die Zellen werden dreimal mit PBS pH 7.4 gewaschen. Abschließend wird das Antikörperfragment HIPS-scFv-425-Fc (60 µg) in PBS (pH 7.4, 0.2 M Arginin) hinzugegeben (finale Volumen 300 µL). Nach 5 Minuten, 15 Minuten und 30 Minuten Inkubationszeit mit HIPS-scFv-425-Fc wird ein *Z-stack* aufgenommen (vgl. Tabelle 5-5).

Tabelle 5-5 Parameter für das *live cell imaging*

Parameter	Wert
optische Korrektur	<i>plan-apochromatic</i>
Numerische Apertur	1.4
Vergrößerung	40 x
Differentialinterferenzkontrast	1.4
Medium	Öl
Auflösung	1024 x 1024
Farbtiefe	16 Bit
Laser (Blau)	405 nm
Laser (Grün)	488 nm
Laser (Rot)	639 nm

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1 Synthesen

Der Aldehyd in der Seitenkette von FGly ist ein in Peptiden und Proteinen einzigartiges Motiv, welches als reaktive Carbonylgruppe durch chemoselektive Reaktionen adressiert werden kann. Dies wurde in grundlegenden Arbeiten in der ortsspezifischen Markierung, bioorthogonalen Konjugation und orientierter Immobilisierung von Proteinen genutzt.^{[2][171]}

In der Peptidchemie wurde ein R-C α -Formylglycin-diethylacetal während der Totalsynthese des macrocyclischen Antibiotikums Capreomycin IB eingesetzt. Während der Amid Kupplung mittels EDC und HOBt wurde jedoch eine Epimerisierung am C α -Kohlenstoffatom beobachtet.^[172] In Arbeiten von J. Rush *et al.* wurde die Synthese eines Fmoc-FGly(OEt)₂-OH Bausteins beschrieben. Dieser wurde für die Peptidsynthese eingesetzt und die Autoren beschreiben die Isolierung von enantiomerenreinen Produkten.^[173] Während der Entschützung der Aldehyd-Peptide konnten keine Silane oder Thiole als *Scavenger* eingesetzt werden. Als weiteren Nachteil kam es bei der globalen Entschützung dieser Peptide unter sauren Bedingungen zu einer Hydroxyalkylierung des Aromaten, zwischen der Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) Schutzgruppe der Arginin-Seitenkette, mit dem Fmoc-FGly Baustein.^[173]

Aufgrund dieser Nachteile wurde in dieser Arbeit ein chemoenzymatischer Ansatz für die Derivatisierung von Proteinen und Peptiden gewählt. Nach der Synthese der Substrat-Peptide und der Expression der Substrat-Proteine erfolgte die Generierung des Aldehyds C α -Formylglycin (FGly) in einer Biotransformation. Durch das C α -Formylglycin-generierende Enzym (FGE) wurde die Seitenkette eines Cystein-Rests innerhalb der Konsensus-Sequenz (C-x/T-P-x/S-R) zum Aldehyd oxidiert.^[66]

In diesem Kapitel wird die Synthese der Edukte und Bausteine diskutiert, die im Anschluss für die Konjugation mit FGly in Peptiden und Proteinen eingesetzt wurden. Hierfür wurden in dieser Arbeit vier verschiedene Reaktionen erprobt. In Abschnitt 6.1.2 wird die Synthese eines Hydroxylamin-Bausteins für die Oxim-Ligation beschrieben. Darüber hinaus wird, wie in Abschnitt 6.1.3 gezeigt, ein Baustein für die HIPS-Ligation hergestellt und in Abschnitt 6.1.4 wird die Synthese eines Pyrazolons für die *trapped*-Knoevenagel Konjugation beschrieben. Der Abschnitt 6.1.8 beschreibt die Synthese von stabilisierten Yliden für Wittig-Reaktionen. Alle Bausteine enthalten entweder ein Azid für die Huisgen-Cycloaddition oder können über die freie Carbonsäurefunktion mit dem PEG-Azid-Linker **12** verknüpft werden. Diese Funktionalitäten sollen ein modulares System garantieren, um verschiedene funktionelle Gruppen zu Konjugieren.

6.1.1 Synthese von Substratpeptiden für FGE

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität von Δ FGE und mtbFGE *in vitro* und der Untersuchung des Einflusses von Sequenzvariationen auf die katalytische Aktivität der Enzyme, wurden verschiedene Modellpeptide (vgl. Tabelle 6-1) verwendet. Nach der Biokonversion mit FGE dienen die Peptide als Edukte, um die Konjugationsreaktionen zu erproben.

Tabelle 6-1: Sequenzen von Substratpeptiden für Δ FGE und mtbFGE. Das Kernmotiv C(X/T)P(X/S)R ist in Rot hervorgehoben. Die Aminosäuren TGR aus der Konsensussequenz sind in Blau gezeigt. Alle dargestellten Peptide sind am N-terminus acetyliert und am C-terminus amidiert.

#	Sequenz
CS1	Ac-MTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRS-NH ₂
68	Ac-YLCTPSRAALLTGR-NH ₂
69	Ac-YACAPSRGGALTGR-NH ₂
70	Ac-YLCTPSR-NH ₂

Das Peptid **CS1** enthält die Aminosäuren AS60-80 der Arylsulfatase A mit den zusätzlichen Aminosäuren Methionin und Serin. Diese Sequenz der Arylsulfatase A zählt zu den nativen Substraten von FGE und dient als Positivkontrolle für die Bestimmung der Enzymaktivität.^[66] Peptid **68** besteht aus dem Kernmotiv und der Hilfssequenz TGR (Abschnitt 2.3.4). Außerdem wurde eine aromatische Aminosäure hinzugefügt, um einen höheren Extinktionskoeffizienten zur Verbesserung der UV/Vis Detektion zu erhalten. Dieses Peptid aus 14 Aminosäuren ist ein Beispiel für ein verkürztes Substrat im Vergleich zum CS1-Peptid. Für **69** wurde Thr durch Ala ersetzt, um zu untersuchen, wie signifikant die spezifische Aktivität abnimmt, wenn Mutationen im FGE-Kernmotiv vorliegen. Das letzte Peptid **70** ist eine kurze Sequenz, die ausschließlich das Kernmotiv enthält. Experimente mit diesem Peptid sollten zeigen, wie sich das Fehlen der Hilfssequenz TGR und eine starke Verkürzung der Sequenz auf die Aktivität von mtbFGE und Δ FGE auswirken.

Die Peptide **68**, **69** und **70** wurden mittels Mikrowellen-unterstützter Festphasenpeptidsynthese am Rink-Amid-Harz dargestellt. Das Harz wurde mit einem Äquivalent Aminosäure unter Anwendung des Kupplungsreagenzes TBTU, auf den gewünschten Beladungsgrad bezogen, beladen. Als nicht nukleophile Base wurde DIPEA eingesetzt. Nach Absättigen der restlichen freien Amine am Harz durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und Pyridin erfolgte die Elongation der Peptidsequenz. Für diese Synthese wurde Fmoc als temporäre Schutzgruppe am N-Terminus der Aminosäurebausteine eingesetzt. Für die Seitenketten der Aminosäuren wurden säurelabile Schutzgruppen wie Boc oder Trt verwendet. Nach Abspaltung der fertigen Peptide vom Rink-Amid-Harz mittels TFA und einer etherischen Fällung der Rohprodukte, wurden die Peptide mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Da für die Bestimmung der Enzymaktivität eine hohe Reinheit notwendig ist, wurden die Produkte durch RP-HPLC mit Hilfe eines sehr flachen Wasser-Acetonitril-Gradienten analysiert.

Die Synthese von **70** gelang in guten Ausbeuten von 19 % und es wurden nur wenige Fehlkupplungen erhalten. Bei der Synthese der Peptide **68** und **69** kam es zu Fehlkupplungen ab der siebten Aminosäure. Selbst nach doppelter Kupplung von Arg⁷ mit fünf Äquivalenten Aminosäure konnte kein zufriedenstellender Umsatz beobachtet werden. Abbildung 6-1 A zeigt beispielhaft die Analyse von Fehlkupplungen mittels MALDI-ToF-MS. Die Sequenz (TPSRAALLTGR-NH₂) hat einen c*-Wert von 0.91. Dies bedeutet, dass das Peptid dazu tendiert Sekundärstrukturelemente wie β -Faltblatt-Strukturen auszubilden. Dies hat zur Folge, dass weitere Kupplungen aufgrund sterischer Hinderung erschwert sind, was die schlechte Ausbeute der letzten Kupplungsschritte erklären könnte.^[174]

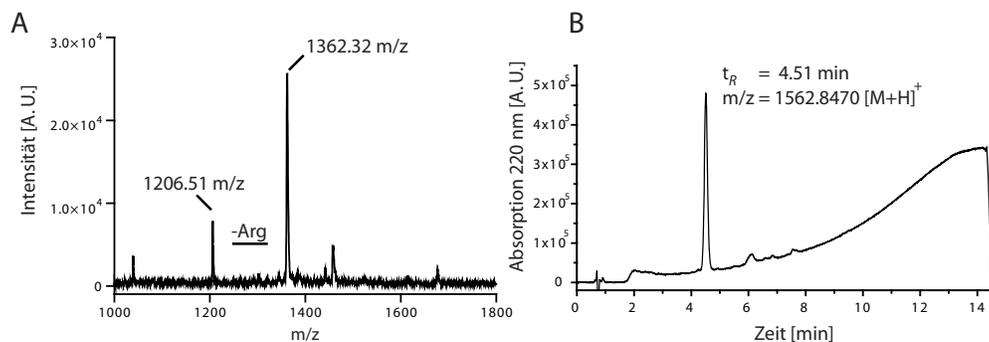


Abbildung 6-1 Fehlkupplungen während der Peptidsynthese von **68**: (A) Analyse des Peptids TPSRAALLTGR-NH₂ mittels MALDI-ToF-MS. Trotz doppelter Kupplung von Arg⁷ mit fünf Äquivalenten Aminosäure ist ein deutliches Signal für die Sequenz ohne Arg⁷ zu erkennen. (B) Analyse der Reinheit von P1 nach der erfolgreichen Synthese mittels RP-HPLC. Im Chromatogramm ist nur ein Signal zu erkennen mit der korrekten Feinmasse für die Sequenz Ac-YLCTPSRAALLTGR-NH₂ (**68**).

Um die Synthese der Peptide **68** und **69** zu optimieren, wurde nach den kritischen Kupplungen eine Acetylierung der Fehlsequenzen durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Beladungsgrad des Rink-Amid-Harzes von 0.8 mmol/g auf 0.4 mmol/g verringert und die Cysteinseitenkette wurde als Disulfid mit *tert*-Butylmercaptan (StBu) geschützt. Peptid **68** wurde so in einer Ausbeute von 5 % mit hoher Reinheit isoliert (vgl. Abbildung 6-1 B) Für Peptid **69** wurde so eine gute Ausbeute von 9 % erhalten.

Nach Abspaltung vom Rink-Amid-Harz und der säurelabilen Schutzgruppen mittels TFA erfolgte ein erster Reinigungsschritt mittels RP-HPLC. Dann wurde die StBu-Schutzgruppe durch TCEP abgespalten und es wurde ein weiterer Reinigungsschritt mittels RP-HPLC durchgeführt. Durch diese Strategie konnten die Fehlkupplungen erfolgreich abgetrennt werden.

6.1.2 Synthese von PEG-Linkern für die Konjugation mit FGly

Die Etablierung eines *Phage Displays*^[175] für die gerichtete Evolution von mtbFGE ist Gegenstand aktueller Studien von der Arbeitsgruppe K. Müller. Um positive Varianten zu selektieren, wurde hierfür ein Baustein benötigt, der FGly auf der Oberfläche der Phagen bindet. Weiterhin ist die Verknüpfung mit einer festen Phase nötig, damit *Pull-down-Assays* zur Selektion der Phagen durchgeführt werden können. Eine einfache Möglichkeit für die Konjugationsreaktion mit dem Aldehyd von FGly bietet die Oxim-Ligation. Diese Reaktion ist ohne großen synthetischen Aufwand durchzuführen und zeigt in wässriger Lösung eine gute Selektivität für Carbonylverbindungen.^[100] Mit dieser bioorthogonalen-Reaktion wurden bereits erfolgreich N-terminale Aldehyde adressiert, die durch die Oxidation eines Serin-Restes durch Natriumperodat erzeugt wurden.^[176]

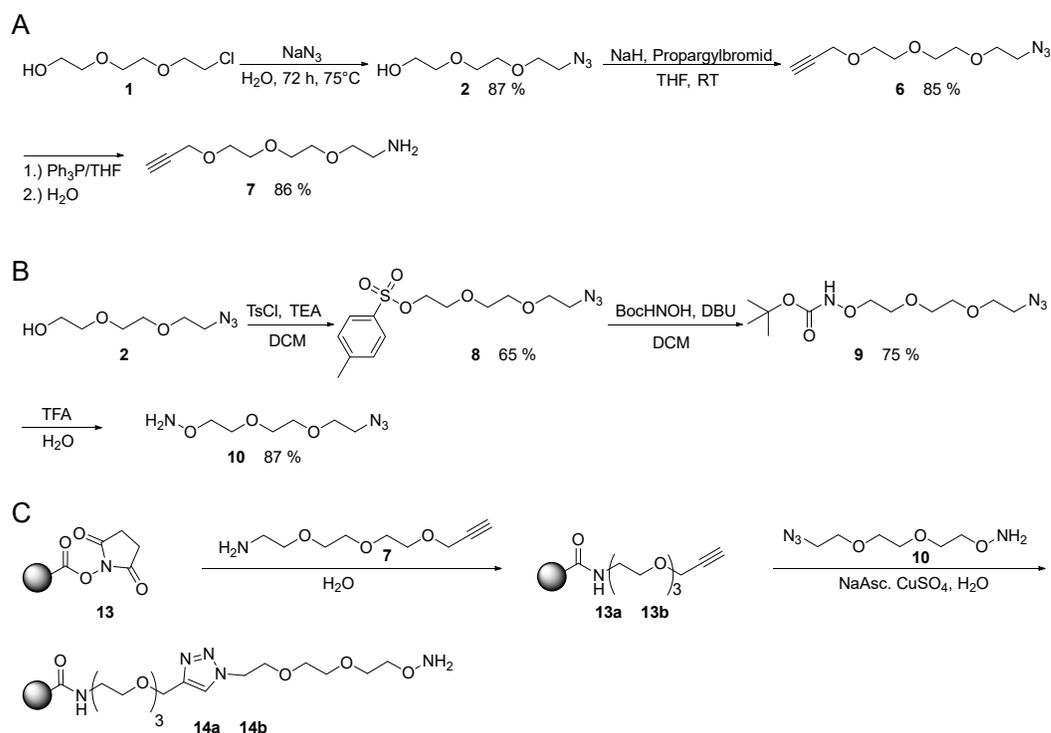


Abbildung 6-2 Syntheseplanung für einen modularen Hydroxylamin-PEG-Linker **14a** **14b**: (A) Syntheseplanung für PEG-Linker **7** mit freiem Amin zur Amidbindung an der festen Phase und einem Alkin für die Huisgen 1,3-Cycloaddition. (B) Hydroxylamin-PEG-Linker **10** für die Konjugation mit FGly. Als zweite funktionelle Gruppe enthält der Linker **10** ein Azid für die Verknüpfung mit Alkin funktionalisierten PEG-Linkern **7**. (C) Strategie für die Funktionalisierung der NHS-Sepharose. Da das Hydroxylamin **10** mit dem NHS-Aktivester reagieren könnte, wird zunächst die feste Phase mit dem Alkin-Linker **7** beladen. Nach dem Absättigen der restlichen Aktivester mit Ethylamin **13a** oder Ethanolamin **13b** wird eine Huisgen 1,3-Cycloaddition mit dem Hydroxylamin-PEG-Linker **10** durchgeführt.

Gängige feste Phasen für *Pull-down-Assays* sind mit NHS-Aktivester funktionalisierten Oberflächen kommerziell erhältlich. Daher wurde bei der Syntheseplanung ein

modulares Linkersystem entworfen, welches die Konjugation mit Aldehydfunktionalisierten Phagen ermöglichen sollte. Abbildung 6-2 fasst die Syntheseplanung dieses Projekts zusammen. Da Hydroxylamin **10** mit dem NHS-Aktivester der NHS-Sephrose reagieren könnte, wurde die feste Phase, wie in (C) dargestellt, im ersten Schritt mit einem Alkin-PEG-Linker **7** konjugiert. Anschließend erfolgte durch eine Cu^I-katalysierte Huisgen 1,3-Cycloaddition die Verknüpfung mit dem Hydroxylamin-Motiv **10** für die Konjugation mit FGly.

Die Synthese der Alkin- **7** und Azid-Linker **10** wurde ausgehend von 2-(2-(2-Chlorethoxy)ethoxy)ethanol (**1**) durchgeführt. Die Chloridfunktion wurde durch nukleophile Substitution in das Azid **2** überführt.^[177] Nach Abtrennung der Salze durch eine Extraktion wurde das Produkt **2** in einer guten Reinheit isoliert. Die Protonen der Methylengruppe in α -Position zum Azid sind zu Frequenzen im tieferen Feld bei 3.39 ppm verschoben und stimmen mit der Literaturangabe überein.^[150] Für die Synthese des Alkin-Linkers **6** erfolgte die Umsetzung des Alkohols **2** mit Propargylbromid mittels Williamsens Ethersynthese. Das für die nukleophile Substitution benötigte Alkoholat wurde mit Kalium-*tert*-butanolat gebildet. Im letzten Schritt wurde das Azid **6** durch eine Staudinger-Reaktion zum Amin **7** reduziert.^[178] Die drei Reaktionsschritte vom Chlorid **1** zum Alkin **7** lieferten gute Ausbeuten (87 %, 85 %, 86 %).

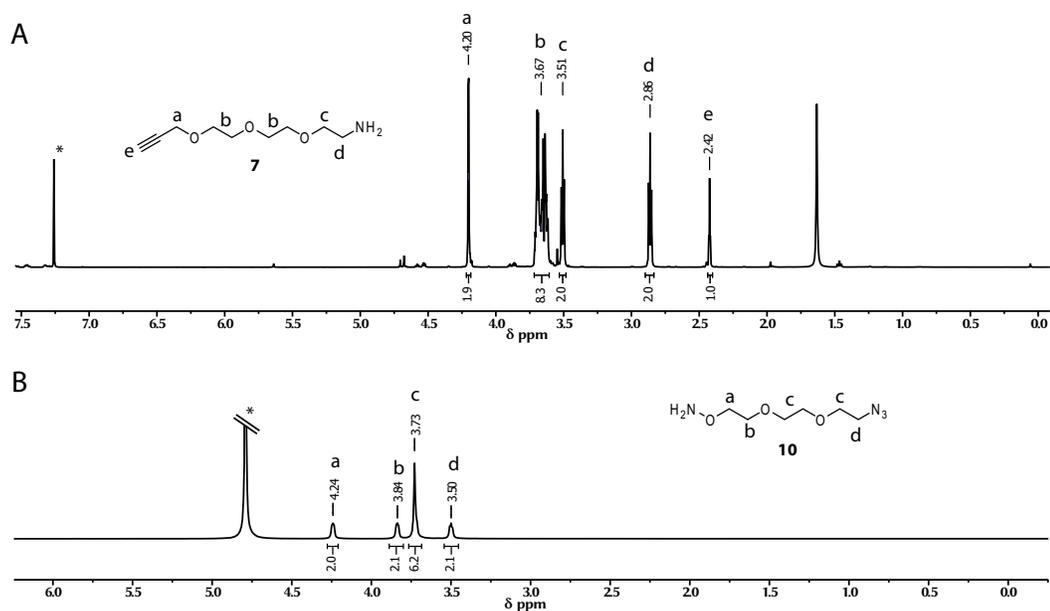


Abbildung 6-3 ¹H-NMR Spektrum des Alkin-Linkers **7** und des Hydroxylamin-Linkers **10**: Im ¹H-NMR Spektrum (A) aufgenommen in CDCl₃ sind die Signale a und e dem gewünschten Alkin zuzuordnen. Die Protonen des restlichen Wassers resonieren bei 1.6 ppm. Spektrum (B) aufgenommen in D₂O zeigt die zu erwartenden Signale a bis d. Die Protonen der Methylengruppe a, benachbart zur Hydroxylamin Einheit, zeigen eine Tieffeldverschiebung im Vergleich zur Methylengruppe d, welche durch den Einfluss des Azides entschirmt wird.

Abbildung 6-3 A zeigt das ^1H -NMR Spektrum der Verbindung **7**. Die Signale e und a belegen die erfolgreiche Synthese des Alkin-Linkers **7**. Das Integral von Dublett a beträgt 2 und das Integral von Triplet e hat einen Wert von 1. Die Kopplungskonstante der Signale liegt bei 2.3 Hz.

Für den Hydroxylamin-Linker **10** wurde Alkohol **2** in das Tosylat **8** überführt, um eine gute Abgangsgruppe zu erzeugen. Zunächst wurde wie in der Literatur angegeben Methansulfonylchlorid eingesetzt,^[11] jedoch wurden mit dieser sehr reaktiven Abgangsgruppe geringere Ausbeuten erzielt, als mit dem etwas stabileren Tosylat. Durch das Tosylat **8** wurde eine Ausbeute von 65 % erzielt, welche deutlich über der in der Literatur angegebene Ausbeute von 41 % für das Mesylat liegt.^[11] Anschließend erfolgte die Umsetzung mit N-Boc-Hydroxylamin zu **9** und nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe im Säuren wurde der Hydroxylamin-Linker **10** in hoher Reinheit isoliert. Die Ausbeuten lagen bei 65–87 %. Das ^1H -NMR Spektrum Abbildung 6-3 B, zeigt die Signale a bis d des Produkts. Die Methylengruppe a, benachbart zu der Hydroxylamin Einheit, zeigt eine Tieffeldverschiebung im Gegensatz zu der Methylengruppe d, welche durch den Einfluss des Azids verschoben ist. Auch hier konnten die Signale des ^{13}C -Spektrums dem Produkt **10** zugeordnet werden.

Wie in Abbildung 6-2 C dargestellt, erfolgte dann die Beladung der NHS-Sepharose, welche als feste Phase gewählt wurde. Der Alkin-Linker **7** wurde hierfür in einer Konzentration von 50 mM in Puffer mit der NHS-Sepharose inkubiert und nach vier Stunden wurde die feste Phase gewaschen. Der Ansatz wurde geteilt und bei der Hälfte der Alkin-*Beads* wurde Ethylamin (**13a**) eingesetzt, um die restlichen Aktivester zu deaktivieren. Für den zweiten Ansatz wurde Ethanolamin (**13b**) verwendet. Durch Funktionalisierung mit entweder einem Alkohol oder einer aliphatischen Gruppe wurden unterschiedlich polare Oberflächen erzeugt.

Die Huisgen-1,3-dipolare Cycloaddition erfolgte unter Kupferkatalyse, indem die katalytisch aktive Cu^{I} -Spezies *in situ* aus CuSO_4 durch Reduktion mit Natriumascorbat generiert wurde. Nach Waschen der Hydroxylamin-*Beads* **14a** und **14b** wurde getestet, ob eine Oxim-Ligation möglich ist. Das FGly-Peptid **73** wurde bei einem pH-Wert von 4.5 mit den *Beads* inkubiert. Der Überstand wurde durch RP-HPLC analysiert, um zu überprüfen, ob das FGly Peptid gebunden werden kann. Abbildung 6-4 zeigt, dass 72 % des Peptids umgesetzt wurden, was auf eine erfolgreiche Oxim-Ligation hinweist, jedoch konnte kein vollständiger Umsatz erreicht werden. Nach zwölf Stunden Inkubationszeit mit den *Beads* **14a** befanden sich noch 28 % der ursprünglichen Peptidmenge in Lösung. Auch mit den *Beads* **14b** konnte die Oxim-Ligation erfolgreich durchgeführt werden. Nach zwölf Stunden wurden 32 % des FGly-Peptids **73** in Lösung gemessen, somit wurde ein Umsatz von 68 % erzielt.

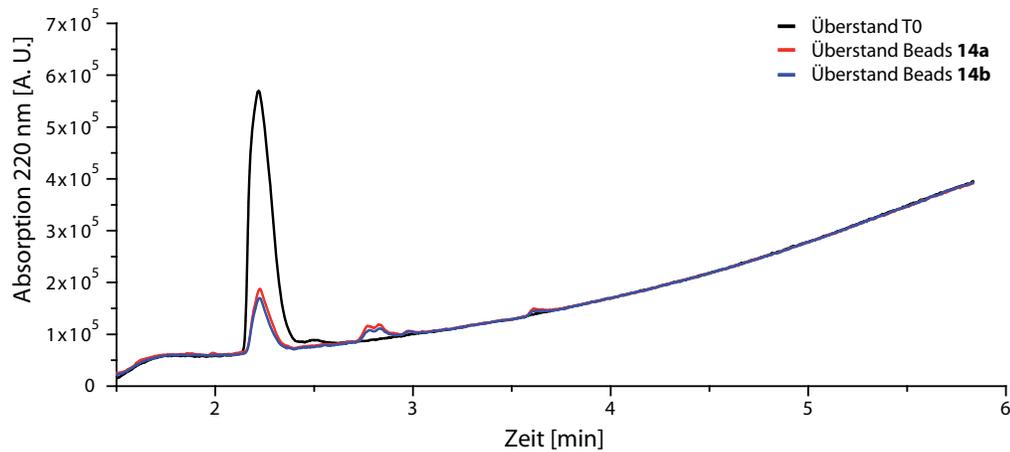


Abbildung 6-4 RP-Chromatogramme bei 220 nm: Analyse der Oxim-Ligation mit den Hydroxylamin-Beads **14a** und **14b**. Das FGly-Peptid **73** wurde in einer Konzentration von 0.3 mM in Zitronensäurepuffer pH 4.5 gelöst und es erfolgte eine erste Messung der Peptidkonzentration (Schwarz). Die Hydroxylamin-Beads **14a** und **14b** wurden zu dem FGly-Peptid **73** gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Dann erfolgte eine weitere Messung der Peptidkonzentration in Lösung. (**14a** Rot und **14b** Blau). Die Integration der Signale zeigt, dass bei den Beads **14a** noch 28 % des Peptids in Lösung vorliegen und bei den Beads **14b** 32 %.

Die beladenen Hydroxylamin-Beads wurden von G. Falck für die Selektion bei einem Phage-Display, zur Optimierung von mtbFGE, eingesetzt. Bei einer katalytisch aktiven mtbFGE Variante trägt der Phage auf der Oberfläche aldehydhaltige-Peptide. Diese Peptide sollen von den Hydroxylamin-Beads gebunden werden, wodurch die Isolierung der Phagen in einem *Pulldown-assay* ermöglicht wird. Mit Hilfe einer Protease werden die aldehydhaltigen-Peptide gespalten und die freien Phagen können beispielsweise für einen weiteren Zyklus eingesetzt werden, oder nach DNA Extraktion und Sequenzierung kann die Mutation analysiert werden. Die Experimente von G. Falck zeigten, dass eine Selektion über Hydroxylamin-Beads grundsätzlich möglich ist, jedoch wurden nur wenige Phagen gebunden. Dies könnte daran liegen, dass im biologischen System geringe Umsätze mit der Oxim-Ligation erreicht wurden. Weiterhin war der Hintergrund an falsch positiven Phagen sehr hoch. Dies könnte an einer Interaktion der filamentösen Phagen mit Sepharose liegen. Auch durch die Optimierung des Waschprotokolls konnte das Problem der unspezifischen Bindung zwischen Sepharose und Phagen nicht gelöst werden (persönliche Kommunikation G. Falck). Somit sollte für zukünftige Experimente eine andere feste Phase gewählt werden. Der Ersatz der festen Phase durch Streptavidin-funktionalisierte Oberflächen sollte die Spezifität des *Pulldown-assays* erhöhen. Weiterhin ist die Oxim-Ligation nicht optimal, da für das biologische System der pH-Wert von 4.5 schädlich sein könnte. Eine Alternative bietet die HIPS-Ligation (Abschnitt 2.5.2) welche bei einem pH-Wert von 6 durchgeführt werden kann.^[25] Diese Konjugationstechnik ermöglicht höhere Umsätze, infolgedessen könnte die Ausbeute an immobilisierten Phagen erhöht werden. Ausgehend von 2-(2-(2-Azidoethoxy)-ethoxy)ethanol (**2**) wurden weitere PEG-Linker synthetisiert. Diese können als Abstandshalter oder für die Konjugation mit anderen funktionellen Gruppen eingesetzt werden. Abbildung 6-5 zeigt die Syntheseplanung.

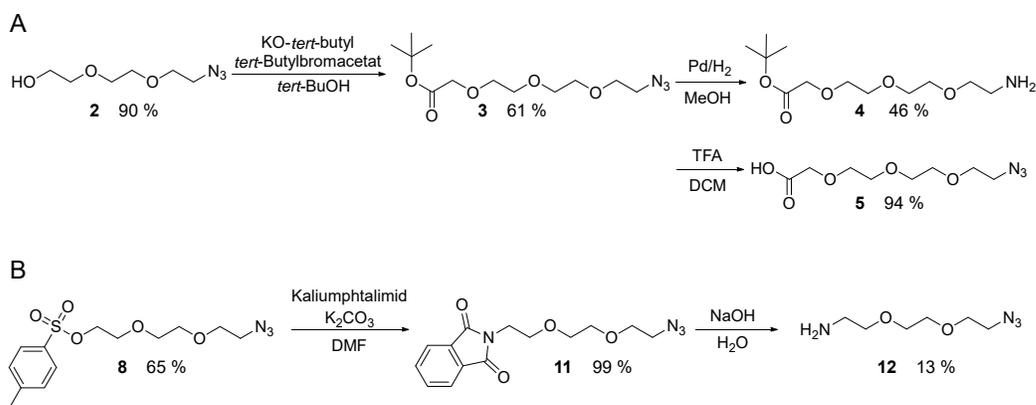


Abbildung 6-5 Syntheseplanung für PEG-Linker: (A) Synthese der Linker mit einem freien Amin **4** oder einer freien Carbonsäure **5** durch Williamson's Ethersynthese. (B) Synthese des Linkers **12** ausgehend vom Tosylat **8** durch Gabriel-Synthese.

Durch Reaktion mit *tert*-Butylbromacetat wurde ein *tert*-Butylester eingeführt **3**. Nach Entschützung der *tert*-Butyl-Gruppe mittels TFA oder Reduktion des Azids durch Wasserstoff unter Palladiumkatalyse wurden die PEG-Linker **4** und **5** erhalten. Weiterhin wurde der Amin-PEG-Azid Linker **12** durch eine Gabriel-Synthese dargestellt.^[179] Im ersten Schritt wurde 2-(2-(2-Azidoethoxy)-ethoxy)ethanol (**2**) in das Tosylat **8** überführt. Der Tosylatrest als gute Abgangsgruppe ermöglichte dann die nukleophile Substitution mit Phthalimid zu **11**. Die ersten drei Stufen dieser Synthese konnten in guten Ausbeuten durchgeführt werden und es wurden hohe Reinheiten erreicht. Die Hydrolyse des Phthalimids **11** gelang lediglich in geringer Ausbeute von 13 %. Die basische Hydrolyse von Phthalimiden verläuft sehr langsam und nur unter drastischen Bedingungen. Höchstwahrscheinlich war eine Reaktionszeit von vier Stunden zu gering gewählt, um eine vollständige Hydrolyse zu erreichen. Eine Alternative wäre die mildere Ing-Manske-Variante in der eine Hydrazinolyse des Phthalimids durchgeführt wird.^[179] Abbildung 6-6 zeigt das ESI-MS Spektrum für den Amino-PEG-Azid-Linker **12** mit dem entsprechenden Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von $m/z = 175.02 [M+H]^+$.

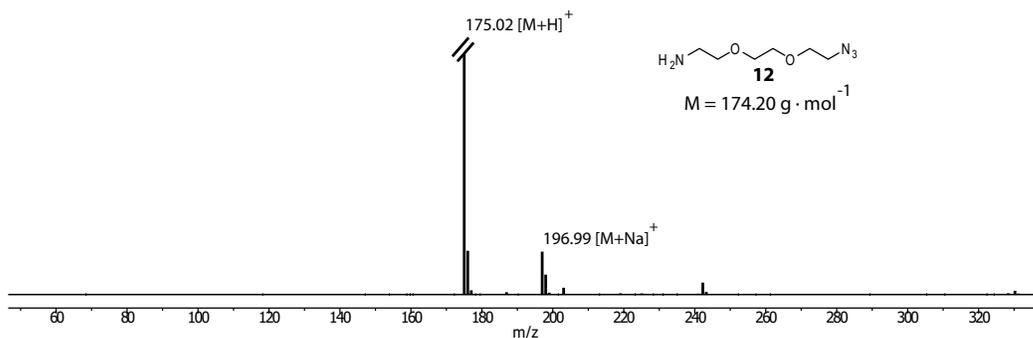


Abbildung 6-6 ESI-MS Spektrum des Amino-PEG-Azid-Linkers **12**: $m/z = 175.02 [M+H]^+$ (berechnet für $[C_6H_{15}N_4O_2]^+$ 175.12) $m/z = 196.99 [M+Na]^+$ (berechnet für $[C_6H_{14}N_4O_2Na]^+$ 197.10)

6.1.3 Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler-Ligation für die Konjugation mit FGly

Eine Möglichkeit für die stabile Konjugation von β -Arylethylaminen mit Aldehyden bietet die Pictet-Spengler-Reaktion, eine Abwandlung der Mannich-Reaktion.^[111] Von Agarwal *et al.* wurden Varianten dieser Reaktion für die bioorthogonale Konjugation mit FGly erprobt.^{[12][113]} Das zentrale Motiv dieser Variante der Hydrazino-*iso*-Pictet Spengler-Ligation (HIPS) ist ein methyliertes Hydrazin in Position 2 des Indols. Das Hydrazin-Motiv kondensiert mit dem Aldehyd von FGly zu einem Hydrazonium-Intermediat, welches durch den nukleophilen Angriff des Indolrings in Position 3 eine hydrolyseresistente Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung ausbildet.^{[12][113]} Die Synthese des geschützten HIPS-Bausteins **24** wurde basierend auf der Arbeit von Agarwal *et al.* durchgeführt.^[113] Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von 2-(Hydroxymethyl)indol (**16**) wurde die Synthese ausgehend von Ethyl-indol-2-carboxylat (**15**) durchgeführt. Der Schlüsselschritt der Synthese war die Oxidation zum Aldehyd **20**, welche in der Literatur mit Dess-Martin-Periodinan durchgeführt wurde.^{[113][180]} Aufgrund der schlechten Atomökonomie dieser Reaktion wurden Alternativen für diese Reaktion erprobt.

Die Reduktion des Esters **15** konnte erfolgreich mit LiAlH_4 durchgeführt werden. Anschließend wurde Alkohol **16** durch eine sterisch anspruchsvolle Silyl-Gruppe geschützt. Das spätere Entschützen von *tert*-Butyldimethylsilyl **17** mittels TBAF gelang in guten Ausbeuten.^[181]

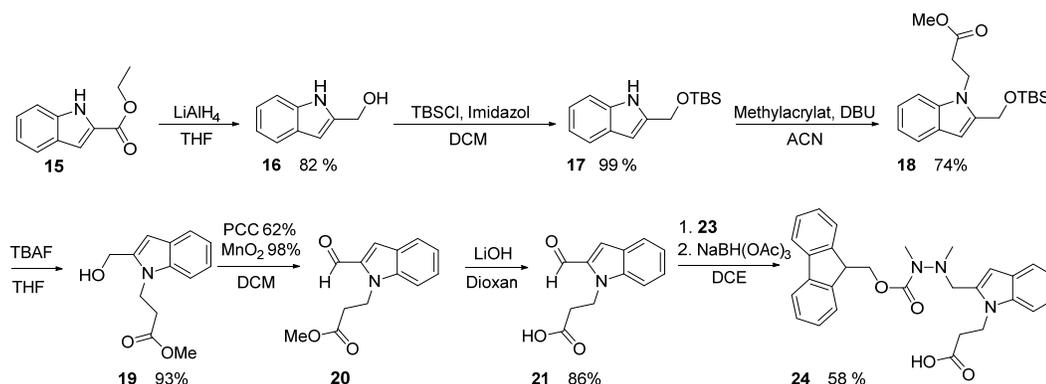


Abbildung 6-7 Synthesepfad für den HIPS-Baustein **24**: Ethyl-indol-2-carboxylat (**15**) wurde durch eine Reduktion zu 2-(Hydroxymethyl)indol (**16**) umgesetzt. Die nächsten Schritte erfolgen nach der Vorschrift von Agarwal *et al.*^[113] Der Schlüsselschritt dieser Synthese ist die Einführung des Aldehyds **20**, für den verschiedene Bedingungen erprobt wurden. Quantitative Ausbeute wurde mit MnO_2 erreicht.

Um Alkohol **19** zum Aldehyd **20** zu oxidieren, wurden verschiedene Reaktionsbedingungen evaluiert. Die Swern-Oxidation, bei der durch den nukleophilen Angriff von DMSO an Oxalylchlorid ein reaktives Sulfonium-Ion gebildet wird,^[182] lieferte nur Spuren des gewünschten Produktes. Die Oxidation mit Pyridiniumchlorochromat (PCC)^[183] war erfolgreich und lieferte akzeptable Ausbeuten von 62 %. Um das kanzerogene PCC besser handhaben zu können, wurde es auf Kieselgel adsorbiert.^[184]

Aufgrund der hohen Toxizität war diese Methode nicht optimal für die Oxidation des Alkohols **19**. Weitere Experimente zeigten, dass die Oxidation des Alkohols **19** zu Aldehyd **20** durch Mangandioxid durchgeführt werden konnte.^[185] Die Reaktion wurde mit fünf Äquivalenten MnO₂ in DCM durchgeführt und es konnten nahezu quantitative Ausbeuten von 98 % erzielt werden. Nach einer Filtration wurde das Rohprodukt **20** direkt für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Diese milde Reaktion ermöglicht die Oxidation von Allyl- Benzyl- und Propargylalkoholen.^[186] Die Selektivität könnte durch die Ausbildung eines π -Komplexes, zwischen dem Olefin oder dem Aromaten, mit der Lewis-sauren Oberfläche der MnO₂-Partikel erklärt werden.^[187] Der Mechanismus dieser Oxidationsreaktion konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Es werden radikalische Mechanismen,^[188] Hydrierungen^[189] oder Fünfring-Übergangszustände^[189] postuliert. Eine weitere Alternative für die Oxidation könnte der Einsatz eines Vanadium-Katalysators sein.^[190]

Der letzte Schritt war eine reduktive Aminierung mit Fmoc-1,2-Dimethylhydrazin (**23**). Als Reduktionsmittel wurde NaBH(OAc)₃ eingesetzt. Eine häufig auftretende Nebenreaktion ist die Reduktion des Aldehyds **20** zum Alkohol **19**. Daher wurde Fmoc-1,2-Dimethylhydrazin (**23**) mit dem Aldehyd **20** vorgelegt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Erst nach vollständiger Bildung des Hydrazons wurde das Reduktionsmittel hinzugegeben. Da es sich jedoch bei der Bildung des Hydrazons um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, konnte die Reduktion zum Alkohol nicht gänzlich verhindert werden und es wurden lediglich Ausbeuten von 58 % erreicht.

Abbildung 6-8 zeigt repräsentative ¹H-NMR Spektren. Die Signale für das an Position 2 substituierte Indol sind in (A) zu erkennen. Nach der Konjugation der Seitenkette in Position 1 des Indols waren die zusätzlichen Signale g, h und i in den erwartenden Multiplizitäten zu erkennen. Die Oxidation des Alkohols **19** zum Aldehyd **20** wird in (C) deutlich. Das Signal f zeigte eine für Aldehyde typische chemische Verschiebung von 9.87 ppm. Insgesamt ist das Indol-Derivat **24** relativ unpolar. Eine Verbesserung des HIPS-Bausteins wäre vermutlich die Einführung eines Heteroatoms in Position 7 des Indolrings.^[15] Wird ein Stickstoffatom an dieser Position platziert wird die Reaktion als aza-HIPS-Ligation bezeichnet.^[15]

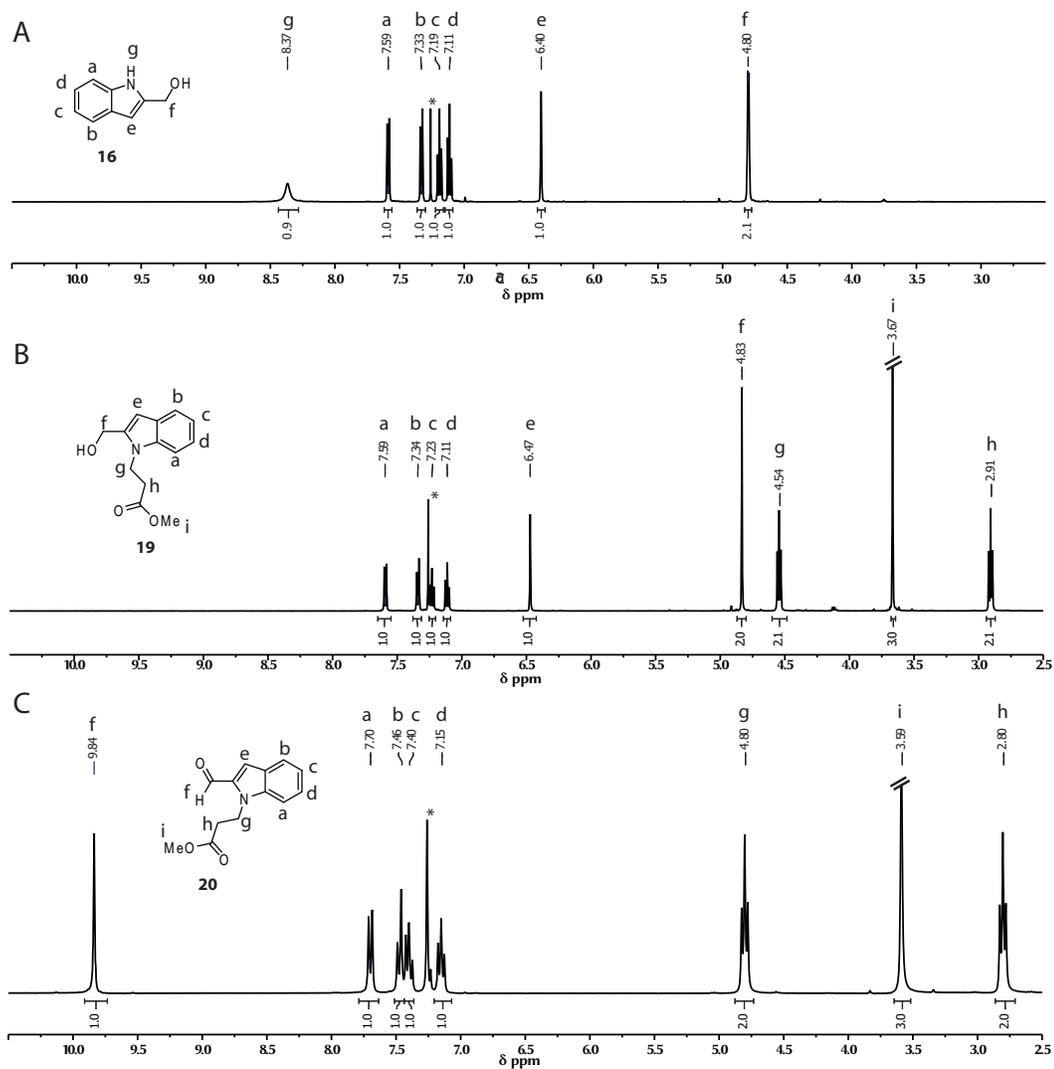


Abbildung 6-8 $^1\text{H-NMR}$ Spektren in CDCl_3 (*): (A) 2-(Hydroxymethyl)indol (**16**), (B) Methyl 3-(2-(hydroxymethyl)-indol-1-yl)propanoat (**19**) und (C) Methyl 3-(2-formyl-indol-1-yl)propanoat (**20**). Die Signale in (A) konnten eindeutig dem Produkt **16** zugeordnet werden. Nach der Einführung der Seitenkette (B) waren die zusätzlichen Signale g, h und i in den zu erwartenden Multiplizitäten zu erkennen. Die Oxidation des Alkohols **19** zum Aldehyd **20** wird in (C) deutlich. Das Signal f zeigt eine für Aldehyde typische chemische Verschiebung von 9.87 ppm.

Für die reduktive Aminierung mit Aldehyd **20** wurde Fmoc-1,2-Dimethylhydrazin (**23**) benötigt, welches nicht kommerziell erhältlich ist. Einen direkten Zugang bietet die Reaktion von 1,2-Dimethylhydrazin mit Fmoc-Chlorid.^[191] Bei dieser Reaktion konnten nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden. Die Reaktion wurde sowohl in DCM bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$,^[157] als auch in ACN bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$,^[12] mit Triethylamin als Base durchgeführt. Mögliche Ursachen für die schlechte Ausbeute könnte die geringe Stabilität der Fmoc-Schutzgruppe im basischen, oder eine Zweitsubstitution am 1,2-Dimethylhydrazin sein. Daher wurde Fmoc-Chlorid mit Methylhydrazin umgesetzt und dann in einer

reduktiven Aminierung mit Formaldehyd methyliert.^[157] Auf diesem Weg konnte Fmoc-1,2-Dimethylhydrazin (**23**) in einer Ausbeute von 23 % über drei Stufen isoliert werden (vgl. Abbildung 6-9).

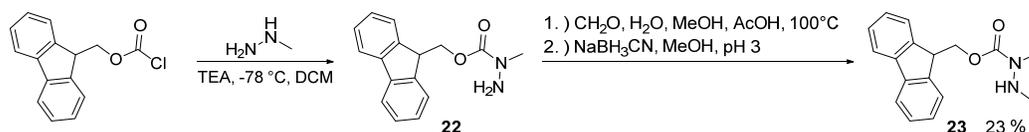


Abbildung 6-9 Synthese von Fmoc-1,2-Dimethylhydrazin (**23**): Die Schutzgruppe für den HIPS-Baustein wurde ausgehend von Methylhydrazin und Fmoc-Chlorid hergestellt. Für die reduktive Aminierung wurde NaBH_3CN als mildes Reduktionsmittel eingesetzt.

6.1.4 Knoevenagel-Konjugation für die Ligation mit FGly

Eine Alternative zur HIPS-Ligation ist die *trapped*-Knoevenagel Konjugation, bei der Ketone und Aldehyde mit CH-aciden Verbindungen als Kohlenstoff-Nukleophil umgesetzt werden.^{[115][116]} Für die bioorthogonale Konjugation mit FGly wurden Pyrazolone eingesetzt.^[16] Basierend auf der Vorschrift von Kudirka *et al.* wurde ein Pyrazolon-Baustein ausgehend von 3-Mercaptopropionsäure (**27**) synthetisiert (vgl. Abbildung 6-10).^[16]

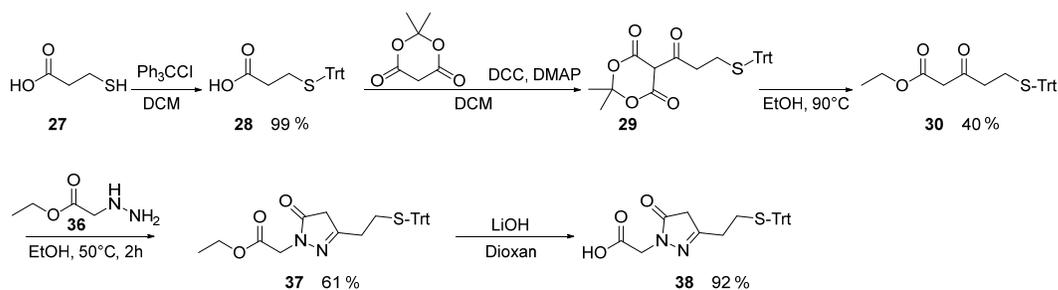


Abbildung 6-10 Synthesepfad für den Pyrazolon-Baustein **38**: Ausgehend von 3-Mercaptopropionsäure (**27**) wurde das Thiol mit einer Tritylschutzgruppe versehen. Dann erfolgte die Umsetzung zum Intermediat **29** durch Meldrumsäure, DCC und DMAP, welches nach Pyrolyse zum β -Ketoester **30** reagiert. Der Schlüsselschritt der Syntheseroute ist die Zyklisierung des β -Ketoesters **30** mit dem Hydrazinderivat **36**. Abschließend wird der Ester mit LiOH verseift.

Die Synthese des β -Ketoesters **30** konnte erfolgreich durchgeführt werden. Nach dem Schützen des Thiols **27** mit Tritylchlorid erfolgte die Reaktion mit Meldrumsäure, welche eine verhältnismäßig hohe C-H-Acidität, mit einem pK_s -Wert bei 4.97 besitzt.^[192] Nach erfolgreicher Reaktion zum Intermediat **29**, findet eine durch thermische Energie ausgelöste pericyclische Reaktion statt. Unter Abspaltung von Aceton und CO_2 wurde ein reaktives Keten erzeugt. Dieses starke Elektrophil reagiert z. B. mit Aminen und Alkoholen und kann daher für die Synthese von β -Ketoestern eingesetzt werden.^[193] Der β -Ketoester **30** wurde über diese Strategie in zwei Schritten mit einer Ausbeute von 40 % dargestellt.

Das für die Zyklisierung benötigte Hydrazin-Derivat **36** war zu diesem Zeitpunkt nicht kommerziell erhältlich, und musste daher selbst dargestellt werden (vgl. Abbildung 6-12). Alternativ wurde die Zyklisierung außerdem mit 2-Hydroxyethylhydrazin durchgeführt. Diese Syntheseroute (vgl. Abbildung 6-11) war erfolgreich und der Pyrazolon-Baustein **32** mit einem Azid für die Huisgen-1,3-dipolare Cycloaddition konnte über zwei Stufen dargestellt werden.

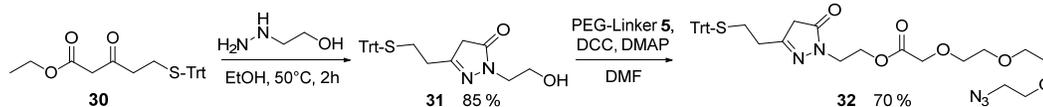


Abbildung 6-11 Alternative Syntheseroute für einen Pyrazolon-Baustein **32**: Für die Zyklisierung wurde 2-Hydroxyethylhydrazin verwendet. Der Alkohol **31** wurde dann in einer Steglich-Veresterung mit dem PEG-Linker **5** umgesetzt.

Für *in vitro* Applikationen können sich Estergruppen als problematisch erweisen, da sie durch Esterasen und Lipasen hydrolysiert werden. Somit besitzen Ester-Konjugate eine geringe Stabilität in biologischen Systemen.^{[194][195]} Nach der erfolgreichen Synthese von Ethyl-2-hydrazinoacetat **36** wurde die Syntheseroute mit 2-Hydroxyethylhydrazin (vgl. Abbildung 6-11) schließlich verworfen. Mit dem Pyrazolon-Baustein **38** ist die Konjugation durch eine Amid-Bindung möglich, wodurch eine höhere Stabilität im biologischen System erreicht wird. Aktuell ist Ethyl-2-hydrazinoacetat **36** kommerziell erhältlich.

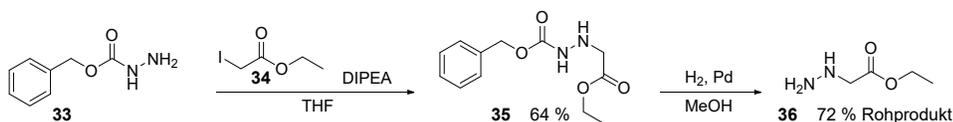


Abbildung 6-12 Synthese von Ethyl-2-hydrazinoacetat **36**: Ausgehend von Iodessigsäureethylester **34** wurde eine nukleophile Substitution mit Benzylcarbamat **33** durchgeführt. Nach Abschützung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Cbz) konnte Ethyl-2-hydrazinoacetat **36** isoliert werden.

Die Synthese von Ethyl-2-hydrazinoacetat **36** wurde zuerst ausgehend von Ethyl-2-hydroxyacetat durchgeführt. Nachdem der Alkohol ins Tosylat überführt wurde, erfolgte die Umsetzung mit Benzylcarbamat **33**. Diese Strategie war bei der Synthese des PEG-Hydroxylamin-Linkers **10** erfolgreich. Die Reaktion des Tosylats mit N-Boc-Hydroxylamin lieferte gute Ausbeuten, jedoch konnte bei der Reaktion des Tosylats mit Benzylcarbamat **33** kein Umsatz beobachtet werden. Ausgehend von Iodessigsäureethylester **34** war die Synthese schließlich erfolgreich. Nach Abspalten der Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Cbz) mit Wasserstoff unter Palladiumkatalyse konnte Hydrazin **36** isoliert werden. Jedoch zeigte die Analyse mittels NMR-Spektroskopie, dass marginale Verunreinigungen im Produkt vorhanden waren, die auch mit einer Säulenchromatographie nicht entfernt werden konnten. Ethyl-2-hydrazinoacetat (**36**) wurde somit unsauber für die Zyklisierung eingesetzt, wodurch die deutlich schlechtere Ausbeute von 61 % im Vergleich zur Zyklisierung mit 2-Hydroxyethylhydrazin zu

erklären ist. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Pyrazolon-Bausteins **38** ist in Abbildung 6-13 gezeigt. Nach der Reinigung des Rohproduktes durch Säulenchromatographie oder RP-HPLC wird die Enol-Form von **38** isoliert.

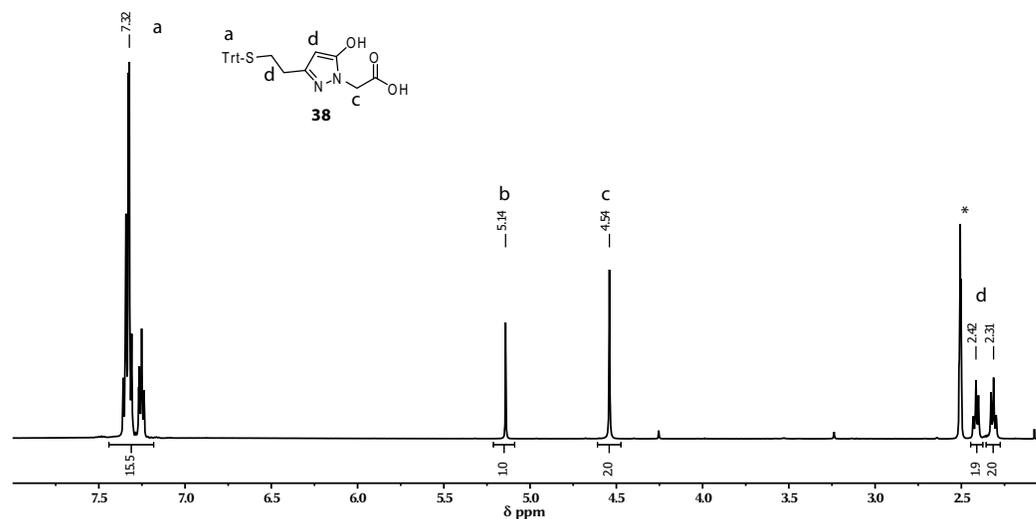


Abbildung 6-13 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum aufgenommen in DMSO-d_6 (*): Das Singulett bei 5.44 ppm mit einem Integral von eins zeigt, dass die Enol-Form des Pyrazolons **38** isoliert wurde.

6.1.5 Synthese von Fluorophoren

Neben den Bausteinen für die FGly-Ligation werden Fluorophore benötigt, um die Peptid/Antikörper-Konjugate im biologischen System zu testen. Um eine orthogonale Kupplungsfunktion zu erzeugen, wurden die Fluorophore mit einem Alkin synthetisiert. In Analogie zu der Arbeit von Chen *et al.*^[196] wurde 5(6)-Carboxyfluorescein (**44**) mit Propargylbromid in einer Williamson-Synthese umgesetzt und im Folgenden konnten die Esterfunktionalitäten selektiv mit Lithiumhydroxid verseift werden. Nach Reinigung mittels präparativer RP-HPLC wurde Propargyl-Carboxyfluorescein **46** isoliert. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten zwei Signalsätze im Verhältnis eins zu eins beobachtet werden, welche von den beiden Konstitutionsisomeren erzeugt werden.^[159]

Propargyl-carboxyfluorescein **46a** wurde trotz Einschränkungen bereits erfolgreich für die Fluoreszenzmarkierung von Naturstoffen eingesetzt.^{[197][198]} C. Weiß konnte bei der Synthese von Cryptophycin-Fluorescein-Konjugaten^[199] zeigen, dass die Fluoreszenzintensität von Propargyl-carboxyfluorescein **46a** zehnfach geringer ist als im Vergleich zu 5(6)-Carboxyfluorescein (**44**).^[159] Weiterhin ist Carboxyfluorescein **46a** bei pH-Werten unter 4 nicht mehr fluoreszent, da die Verbindung wie in Abbildung 6-14 gezeigt lactonisiert **46b**.^[200] Der pH-Wert im Lysosom liegt bei 4.5 bis 5.0^[201] daher ist anzunehmen, dass bei der Aufnahme der Peptid/Antikörperkonjugate in die Lysosomen die Fluoreszenzintensität abnimmt.

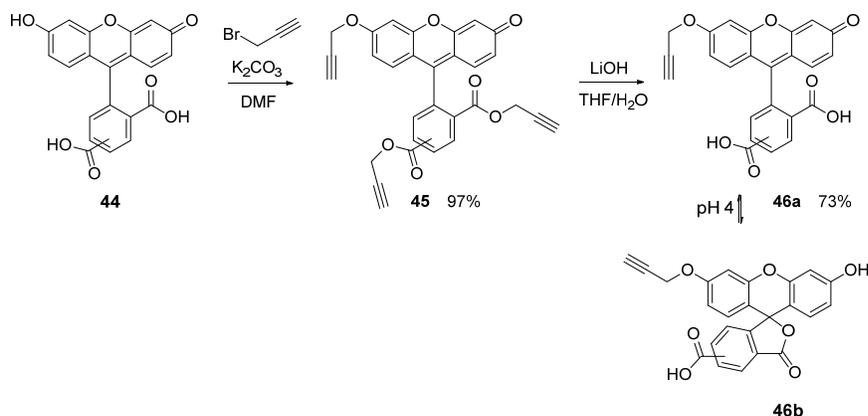


Abbildung 6-14 Synthese von Propargyl-carboxyfluorescein **46a**: Die Synthese von **46a** wurde ausgehend von 5(6)-Carboxyfluorescein (**44**) nach der Vorschrift von Chen *et al.* durchgeführt.^[196]

Als Alternative zum Propargyl-carboxyfluorescein **46a** wurde ein Fluorophor in Anlehnung zu Kele *et al.* hergestellt.^[202] Die physikalischen Eigenschaften der literaturbekannten Fluorophore **78** und **79** sollten einen Förster resonance energy transfer (FRET)^[203] mit dem Propargyl-carboxyfluorescein **46a** ermöglichen. Zusätzlich zeigt das Fluorophor **78** einen langen Stokes-Shift von 120-125 nm.^[202] Die in der Literatur von P. Kele *et al.* beschriebenen Synthese setzt ein Cyclookten-Derivat **79** für kupferfreie Azid-Alkin-Cycloadditionen ein.^[202] Aufgrund der besseren Verfügbarkeit, wurde in dieser Arbeit ein Derivat des Fluorophors mit einem Alkin hergestellt.

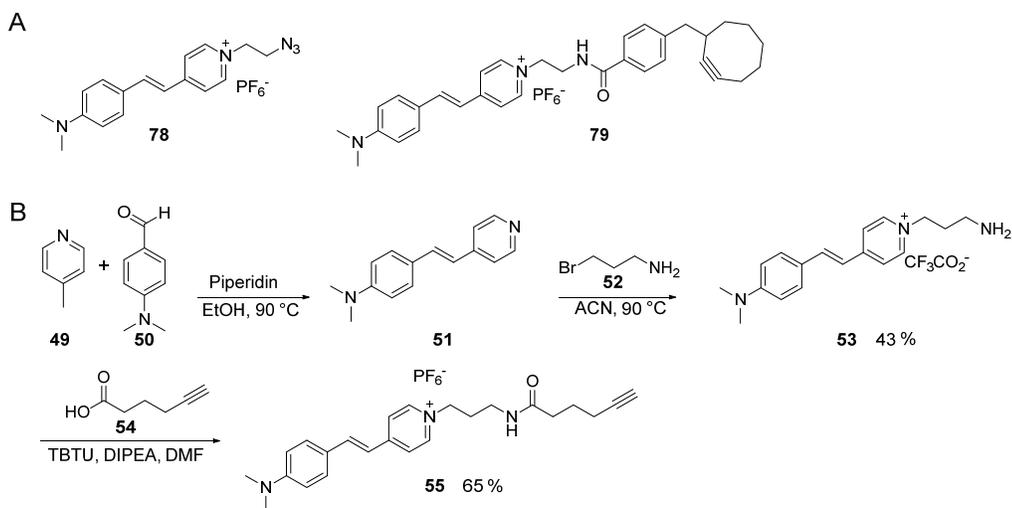


Abbildung 6-15 Synthese des Fluorophors **55** für die Huisgen-Cycloaddition mit Aziden: (A) zeigt die Struktur der Literaturbekannten Fluorophore **78** und **79**. (B) Synthese des Alkin-Fluorophors **55** Ausgehend von 4-(Dimethylamino)benzaldehyd (**50**) und 4-Methylpyridin (**49**).

Abbildung 6-15 zeigt die eingesetzte Syntheseroute ausgehend von 4-(Dimethylamino)benzaldehyd (**50**) und 4-Methylpyridin (**49**). Nach der Knoevenagel-Reaktion der beiden Edukte **49** und **50** wurde eine nukleophile Substitution mit 3-Bromopropylamin (**52**) durchgeführt. Aufgrund der positiven Ladung ist das Diamin **53** sehr gut wasserlöslich jedoch war die Reinigung nur über RP-HPLC möglich. Nach den ersten zwei Stufen und Aufreinigung durch RP-HPLC konnte das Produkt **53** in einer Ausbeute von 43 % isoliert werden. Die Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^[202] Abschließend wurde mit Hilfe von TBTU in DMF eine Amidbindung mit 5-Hexinsäure (**54**) ausgebildet. Das Alkin **55** wurde mit einer Ausbeute von 65 % hergestellt und die Identität wurde durch Massenspektrometrie bestätigt. Aufgrund der positiven-Ladung wurden sehr hohe Signalintensitäten bei MALDI- oder ESI-MS erreicht. Das Signal $m/z = 376.3$ $[\text{M}]^+$ konnte dem Molekülion $[\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}]^+$: 376.2389 zugeordnet werden.

Für die Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften beider Alkin Fluorophore **46a** und **55** wurde ein *excitation-emission-scan* durchgeführt. Die in Abbildung 6-16 gezeigten Spektren wurden von Oliver Wrede (PCIII) aufgenommen. Das Fluoreszenzspektrum von Propargyl-carboxyfluorescein **46a** (A) zeigt ein Anregungsmaximum bei 435 nm und ein bathochrom verschobenes Emissionsmaximum bei 545 nm. Diese Werte stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.^{[203][159]} Die Anregung eines Fluorophors benötigt mehr Energie, daher sind die Emissionsspektren zu längeren Wellenlängen verschoben. Dieser Effekt wird als Stokes-Shift bezeichnet.^[204] Im UV/Vis-Spektrum von Alkin-Fluorophor **55** liegt das Anregungsmaximum bei 535 nm und das Emissionsmaximum bei 624 nm.

Interessanterweise zeigt Alkin-Fluorophor **55** bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm ein weiteres Maximum der Emission. Diese physikalische Eigenschaft spielt beim Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie keine Rolle, da ein Laser mit einer festgelegten Wellenlänge für die Anregung des Fluorophors eingesetzt wird.

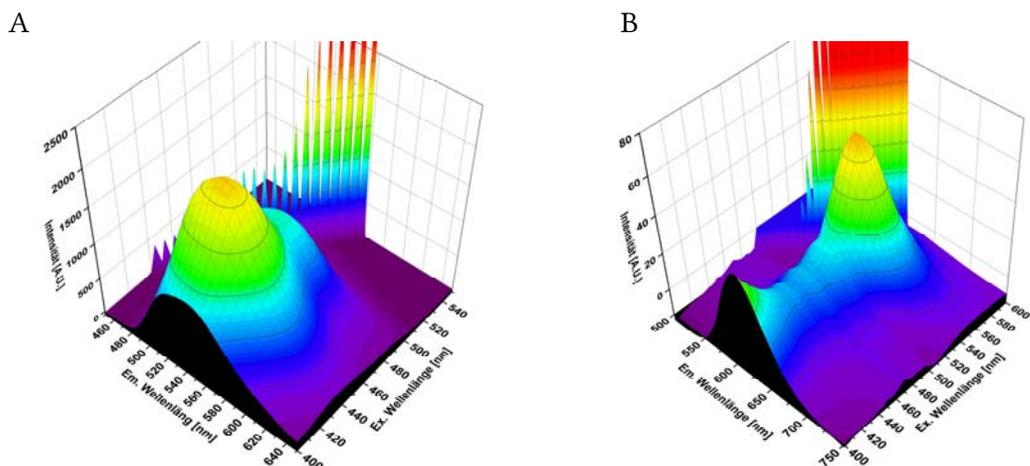


Abbildung 6-16 *excitation-emission-scan* der hergestellten Fluorophore **46a** und **55**: Die Spektren wurden in einem Phosphatpuffer bei pH 7 aufgenommen. Das Propargyl-carboxyfluorescein **46a** A zeigt ein Anregungsmaximum bei 435 nm und ein Emissionsmaximum bei 545 nm. Im Spektrum von Alkin-Fluorophor **55** liegt das Anregungsmaximum bei 535 nm und das Emissionsmaximum bei 624 nm.

Eine Anwendung der hier dargestellten Fluorophore **46a** und **55** als FRET-Paar ist allerdings nicht möglich, da es aufgrund des zweiten Anregungsmaximums von **55** zu einem falsch-positiven FRET kommen würde. Bei der Anregung des Propargyl-carboxyfluoresceins **46a** bei 435 nm würde es außerdem zu einer Anregung des Alkin-Fluorophors **55** kommen und die wenig intensive Emission bei 624 nm würde einen FRET vortäuschen. Für die in der Struktur leicht abweichenden literaturbekannten Fluorophore wurde kein zweites Anregungsmaximum angegeben und die Verbindungen **78** und **79** wurden als potentielle Fluorophore für FRET-Anwendungen publiziert.^[202]

6.1.6 Synthese von Fluorophor-Bausteinen für die FGly-Konjugation

Der Pyrazolon-Baustein **32** aus der in Abbildung 6-11 gezeigten, alternativen Syntheseroute mit 2-Hydroxyethylhydrazin wurde im Folgenden eingesetzt, um die Bedingungen der Huisgen-Cycloaddition zwischen Fluorophor-Alkin **46a** und Azid Baustein **32** zu optimieren. Die Kupfer(I)-katalysierte Variante dieser Reaktion zählt zu den „Klick-Reaktionen“ und liefert 1,4-disubstituierte Triazole. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur und erfordert keine Schutzgruppen, für die übrigen Funktionalitäten der einzelnen Bausteine.^[205]

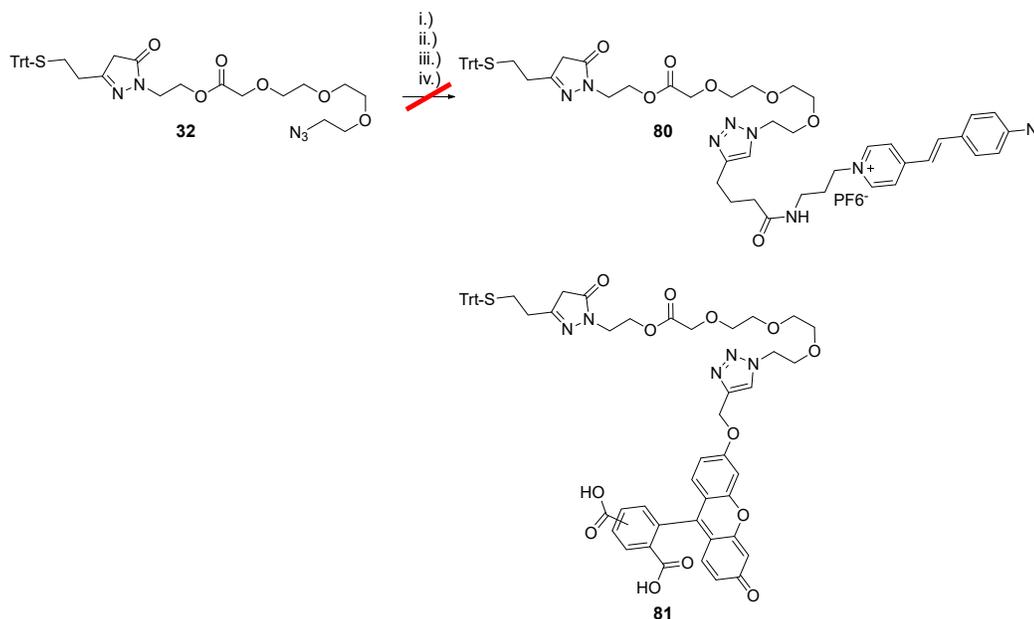


Abbildung 6-17 Huisgen-Cycloaddition mit dem Pyrazolon-Baustein **32** und den Alkin-Fluorophoren **46** und **55**: Für die Reaktion wurden verschiedene Lösungsmittel und Bedingungen erprobt, doch die Produkte **80** und **81** konnten nicht isoliert werden. i) DMF/H₂O, CuSO₄ (1 mM), Natriumascorbat (5 mM) ii) H₂O/*tert*-Butanol, CuSO₄ (1 mM), Natriumascorbat (5 mM) iii) DMF/H₂O, CuI (5 mM), DIPEA (1 mM) iv) H₂O/*tert*-Butanol pH 4, Kupfer

Die Huisgen-Cycloaddition kann in vielen Lösungsmitteln durchgeführt werden und es bestehen verschiedene Möglichkeiten den Kupfer(I)-Katalysator zu erzeugen. Die Kupfer(I)-Salze, wie zum Beispiel Kupferiodid^[206] können direkt eingesetzt werden oder *in situ* durch Reduktion von Kupfer(II)-Salzen, wie Kupfersulfat, erzeugt werden.^[207] Eine dritte Möglichkeit bietet die Komproportionierung von elementarem Kupfer mit Cu^{II}.^[208] Verschiedene Variationen dieser Bedingungen wurden getestet. Kupferiodid wurde in DMF unter Zusatz von Wasser/DIPEA eingesetzt oder die katalytisch aktive Cu^I-Spezies wurde aus Kupfersulfat durch Reduktion mit Natriumascorbat in Wasser/*tert*-Butanol oder DMF erzeugt. Darüber hinaus wurde Kupferpulver im *tert*-Butanol/Wasser-Gemisch im sauren Milieu eingesetzt.^[159] Abbildung 6-17 zeigt das Schema der Reaktion.

Bei keiner der diskutierten Bedingungen konnten die Zielverbindungen **80** oder **81** isoliert werden. Im Laufe der Cycloaddition konnte die Bildung vieler Nebenprodukte durch RP-HPLC beobachtet werden. Abbildung 6-18 zeigt die Analyse der Nebenprodukte, die bei der Synthese von **81** auftraten. Die Massendifferenz zum Produkt **81** liegt bei +174.36 m/z und -67.94 m/z. Der fluoreszierende Teil des Moleküls konnte noch immer anhand der Fluoreszenz der Nebenprodukte nachgewiesen werden, was gegen eine Zersetzung dieser Fragmente spricht. Höchstwahrscheinlich kommt es zu einer Nebenreaktion am Pyrazolon. In der Literatur werden Pyrazolone als Liganden für Kupfer-Komplexe eingesetzt.^{[209][210][211]} Möglicherweise fungiert das Pyrazolon **32** als zweizähliger Ligand für Kupfer, da das Thiol und das Stickstoffatom des Pyrazolons als Koordinationsstelle in Frage kommen. Jedoch konnte anhand der Massendifferenzen die Struktur der Nebenprodukte nicht aufgeklärt werden.

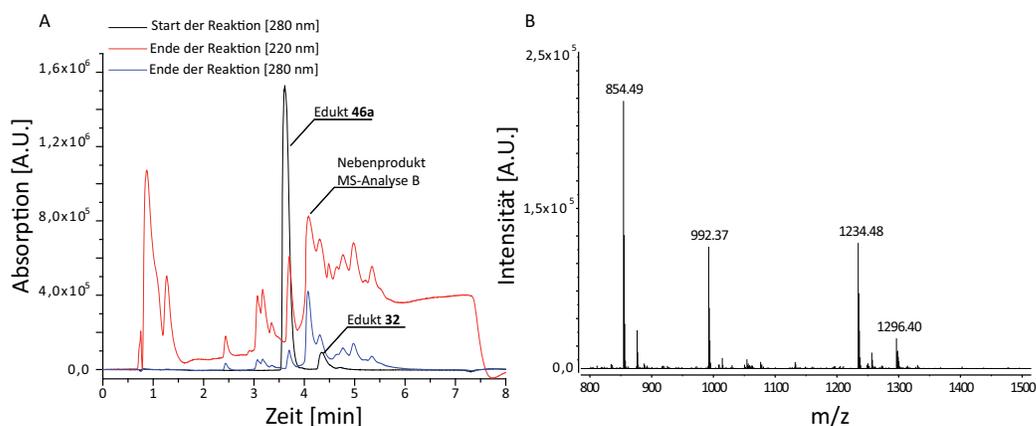


Abbildung 6-18 Analyse der Nebenprodukte der Huisgen-Cycloaddition: Das RP-HPLC-Chromatogramm zeigt exemplarisch den Reaktionsverlauf für die Bedingungen iii) DMF/H₂O, CuI (5 mM), DIPEA (1 mM). (A) Das Chromatogramm der Reaktion zeigt für die Edukte **32** und **46a** (Schwarz 280 nm) ohne Zugabe von CuI zwei scharfe Signale. 16 Stunden nach Zugabe von CuI wurden viele Nebenprodukte gebildet. (Blau 280 nm, Rot 220 nm). Das Nebenprodukt mit einer Elutionszeit von 4.1 min zeigte die charakteristische Fluoreszenz von **46a**. (B) Die Analyse durch ESI-MS zeigt, dass das gewünschte Produkt **81** [C₅₈H₅₄N₅O₁₃S]⁺ = 1060.34 m/z nicht isoliert werden konnte. Die Massendifferenz zu dem gemessenen Nebenprodukten liegt bei +174.36 m/z und -67.94 m/z.

Auch beim Einsatz des HIPS-Bausteins **24** konnten Nebenreaktionen mit Kupfer-Ionen beobachtet werden.^[212] Die modulare Synthesestrategie erlaubt an dieser Stelle eine unterschiedliche Reihenfolge der einzelnen Verknüfungsreaktionen. Daher wurde zuerst die Huisgen-Cycloaddition zwischen PEG-Azid-Linker **47** und Alkin-Fluorophor **46a** durchgeführt. Anschließend wurden beide Fragmente durch eine Amidbindung verknüpft. Abbildung 6-19 zeigt den Aufbau der Komponenten. Die Huisgen-Cycloaddition wurde in DMF mit Kupferiodid und katalytischen Mengen DIPEA durchgeführt. Bei dieser Reaktion wurden für eine „Klick-Reaktion“ schlechte Ausbeuten von 63 % für Triazol **59** und 20 % für Triazol **61** erzielt.

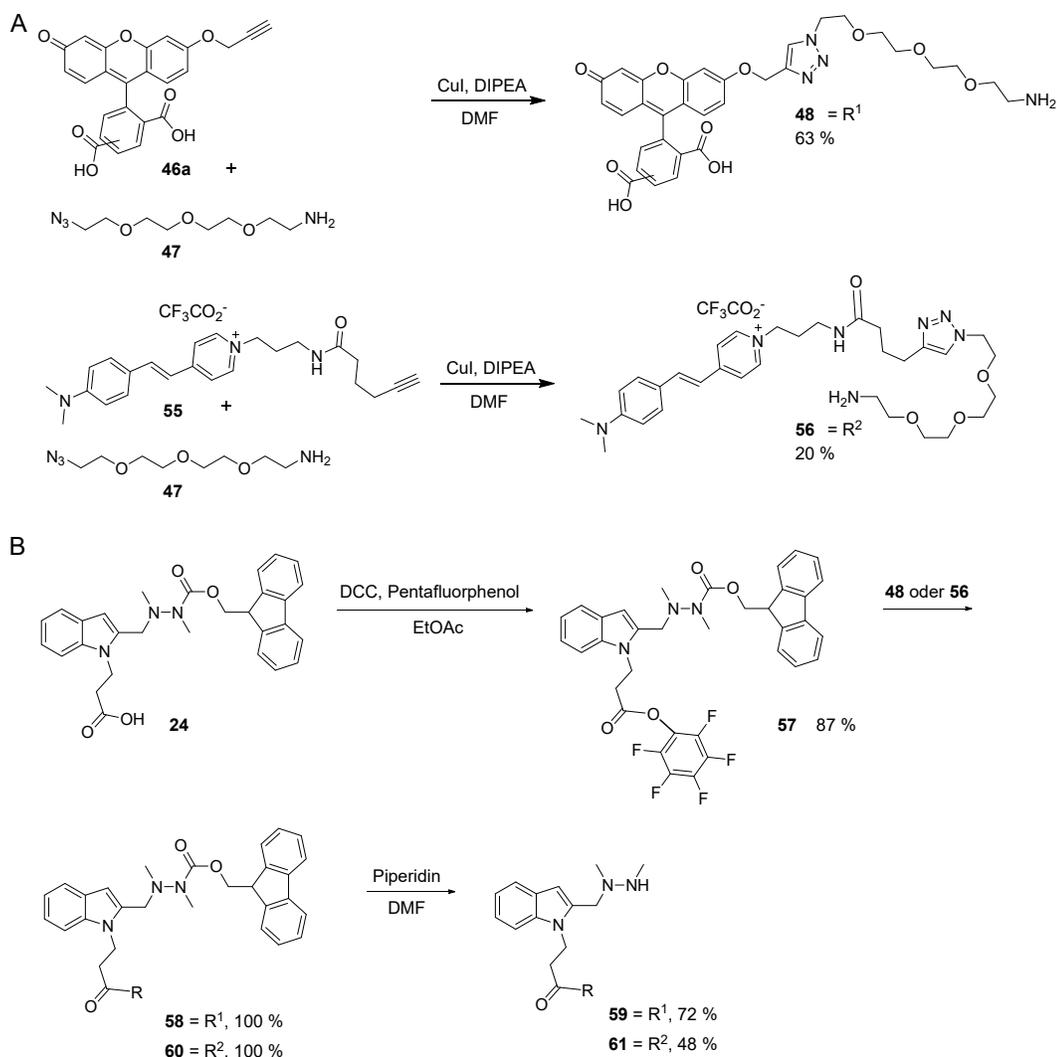


Abbildung 6-19 Synthese von HIPS-Fluorophor-Bausteinen **59** und **61**: Im ersten Schritt (A) wurde die Huisgen-Cycloaddition mit Alkin-Fluorophor **46a** und PEG-Azid-Linker **47** durchgeführt. Im zweiten Schritt wurde die Carbonsäure am HIPS-Baustein **24** in einen reaktiven Pentafluorphenylester **57** überführt, danach wurde die Amidbindung mit den PEG-Fluorophor-Bausteinen **58** und **60** ausgebildet.

Für weitere Experimente sollten daher verschiedene Bedingungen für die Cycloaddition erprobt werden wie z. B. die *in situ* Generierung von Cu^I durch Reduktion mit Natriumascorbat in Wasser/*tert*-Butanol. Die Aktivierung der Carbonsäure des HIPS-Bausteins **24** wurde mit Pentafluorphenol und DCC durchgeführt. In wässriger Lösung besitzt dieser Aktivester im Vergleich zum NHS-Estern eine höhere Halbwertszeit.^{[213][214]} Das Rohprodukt wurde mittels RP-HPLC gereinigt. Auf diesem Weg war es möglich den Aktivester **57** in Ausbeuten von 87 % zu isolieren und zu lagern. Aktivester **57** und der jeweilige PEG-Fluorophor wurden in wenig DMF gelöst und es konnten quantitative Ausbeuten bei der Kupplung erreicht werden. Abschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin in DMF abgespalten. Bei Fluorophor **61** wurde im letzten Schritt das Gegenion gegen PF₆⁻ ausgetauscht.

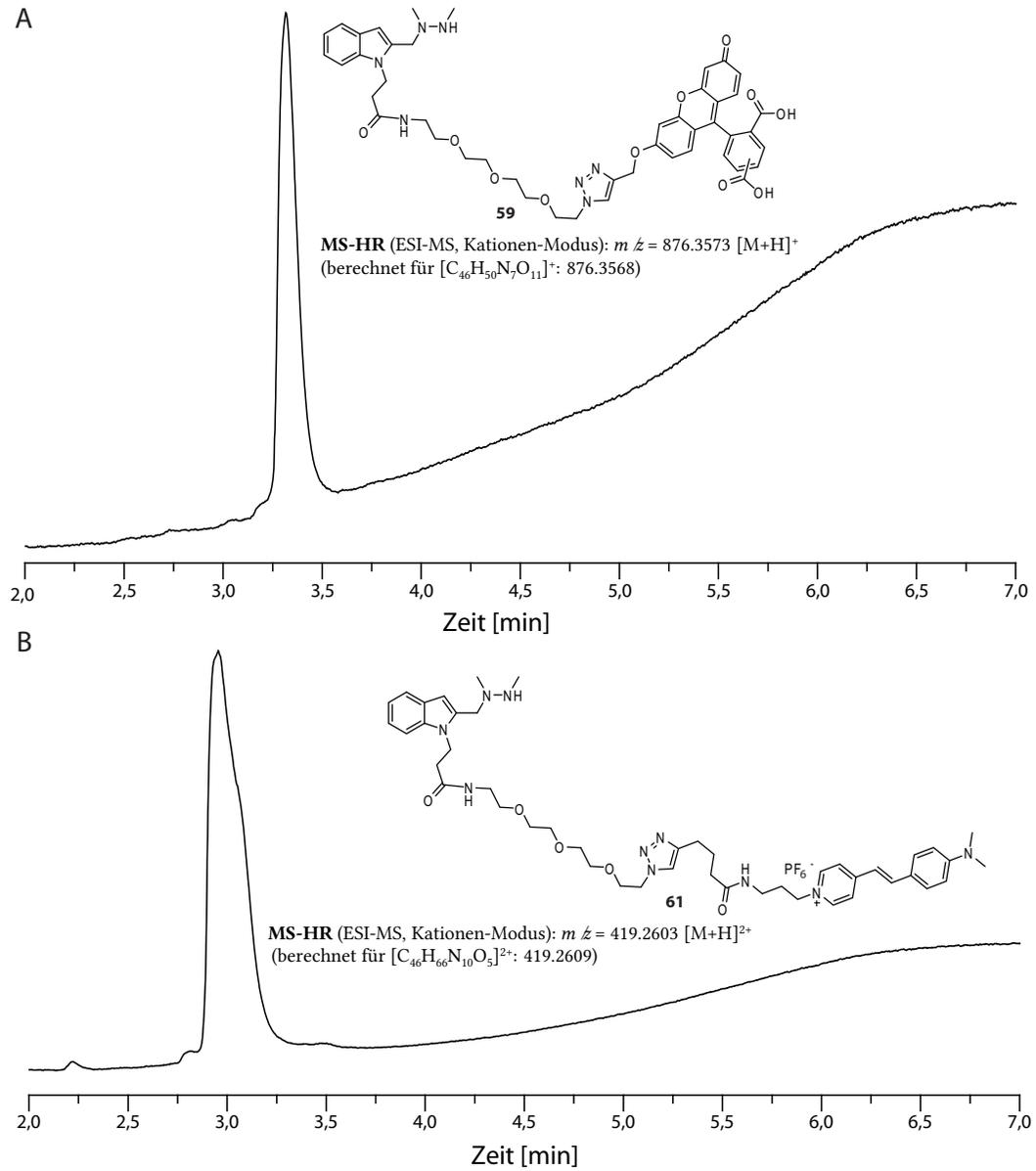


Abbildung 6-20 Chromatogramme der HIPS-Fluorophorbausteine **59** und **61**:. Die RP-HPLC, aufgenommen bei 220 nm zeigt keine Verunreinigungen im Produkt und die HR-ESI-Massenspektren (nicht abgebildet) bestätigten die Identität der Moleküle.

6.1.7 Synthese von Bausteinen für die Immobilisierung von FGE

Bei der Biotransformation der Modellpeptide **68**, **69** und **70**, mit mtbFGE, kam es zur Enzympräzipitation nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden. Die geringe Stabilität von mtbFGE während der Oxidation von Cystein zu FGly war der ratenlimitierende Faktor der Biotransformation. Weiterhin wurde ein Reinigungsschritt nach der Enzymreaktion benötigt, um das Substrat-Peptid oder Protein von mtbFGE zu separieren. Die Immobilisierung von mtbFGE könnte also zwei Vorteile erzeugen. Zum einen eine erhöhte Enzymstabilität und zum anderen eine einfache Abtrennung von mtbFGE durch Filtration.^[215] Für die Immobilisierung von mtbFGE wurde die *trapped*-Knoevenagel Konjugation ausgewählt. Die biochemischen Experimente werden in Abschnitt 6.2.5 diskutiert und die Synthese des benötigten Bausteins wird in diesem Abschnitt beschrieben. Als feste Phase wurde das RELIZYME HA403 Harz ausgewählt, welches für die Immobilisierung von Enzymen entwickelt wurde. Dieses Harz trägt primäre Amine auf der Oberfläche, über welche eine Funktionalisierung mit Amidbindungen möglich ist.

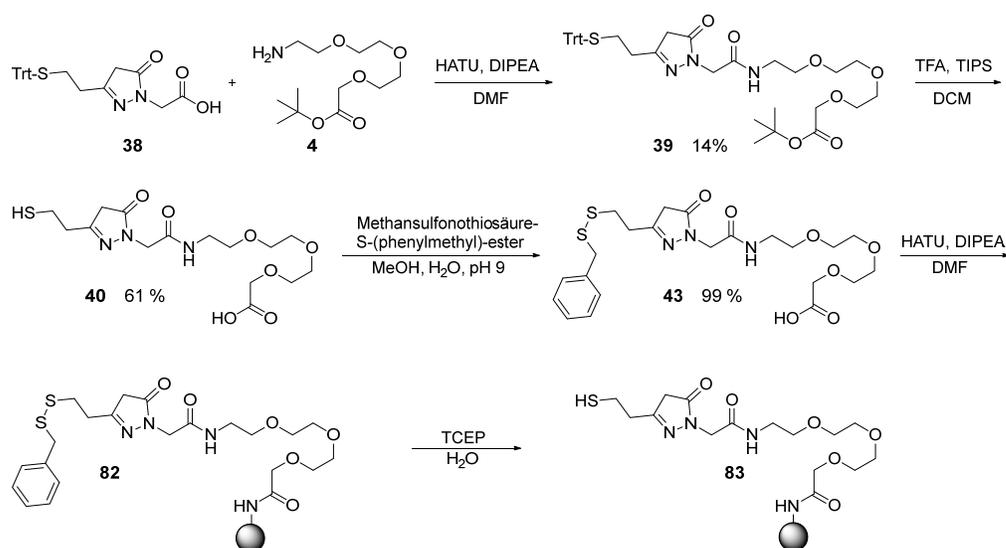


Abbildung 6-21 Syntheseplanung für die Immobilisierung von mtbFGE mit Hilfe der *trapped*-Knoevenagel Konjugation: Ausgehend vom Pyrazolon **38** wurde ein PEG-Linker **4** sowie das RELIZYME HA403 Harz über eine Amidbindung gekuppelt. Für die finale Entschützung in wässriger Lösung am Harz wurde das Thiol **40** als Disulfid geschützt.

Die freie Carbonsäure am Pyrazolon **38** wurde mit HATU aktiviert. Der resultierende Aktivester reagiert durch den Nachbargruppeneffekt des Pyridin-Stickstoffs von HATU vergleichsweise schneller mit Aminen zu Amid. Die Reaktion wurde, wie in der Literatur üblich, in DMF mit DIPEA als Base durchgeführt.^[216] Bei dieser Reaktion wurden sehr geringe Ausbeuten von 14 % erreicht. Dies könnte daran liegen, dass das Pyrazolon **38** als Nukleophil mit dem Aktivester reagiert. Nach Reinigung durch RP-HPLC wurde das Produkt **39** erfolgreich isoliert. Die Triphenylmethyl-Schutzgruppe (Trt) und die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) wurden im sauren mit TFA abgespalten. TIPS wurde als externes Nukleophil hinzugefügt, um eine Reaktion

zwischen Boc-Kation und einem Nukleophil des Bausteins (z. B. des Thiolats) zu verhindern. Das Thiol wurde dann bei pH 9 mit Methansulfonothiosäure-S-(phenylmethyl)-ester als Disulfid geschützt. Dieses Reagenz wurde in einer Stufe aus Methanthiosulfonat und Benzylbromid hergestellt. Insgesamt war das Umschützen des Thiols in guten Ausbeuten möglich. Abbildung 6-22 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Pyrazolons **43** welches für die Immobilisierung eingesetzt wurde. Alle Signale konnten dem gewünschten Produkt **43** zugeordnet werden. Es liegt ein Tautomerengemisch der Keto- und Enol-Form vor, wobei laut Integralverhältnis die Enol-Form begünstigt ist. Die Signale b und d können dem Enol zugeordnet werden. Die Signale von k und i gehören zu dem Keton. Beide Signale stammen von je zwei Protonen. Das Integral von 0.4 zeigt, dass das Keton in einem geringeren Anteil von ca. 20 % vorliegt.

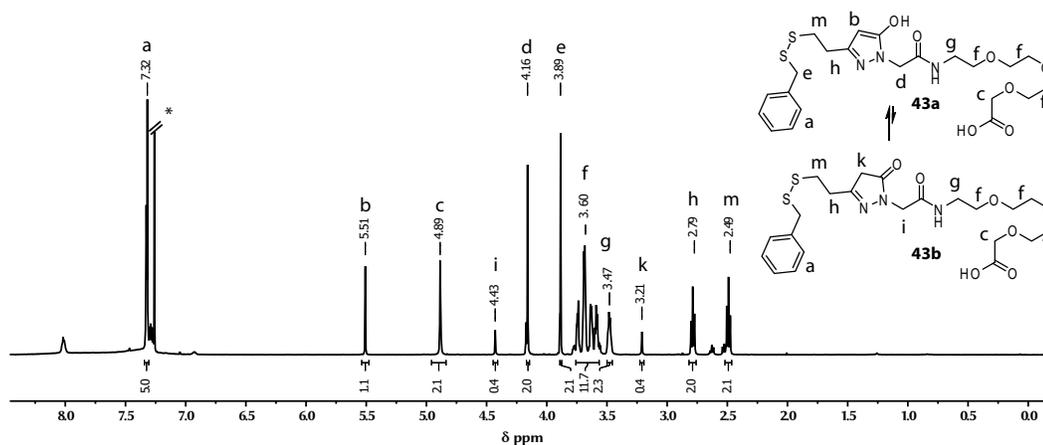


Abbildung 6-22 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Pyrazolon **43** für die Immobilisierung von mtbFGE: Das Spektrum zeigt ein Tautomerengemisch der Keto- **43b** und Enol-Form **43a**.

In einer ersten Testreaktion wurde das RELIZYME HA403 Harz mit dem Pyrazolon **43** mit HATU gekuppelt. Auch hierbei könnte es, wie im ersten Kupplungsschritt mit HATU zu einer Nebenreaktion mit dem Pyrazolon **43** als Nukleophil kommen. Bei weiteren Experimenten sollten daher andere Methoden für die Synthese der Amidbindungen evaluiert werden, um die Ausbeuten zu erhöhen. Eine optionale Route wäre die Synthese eines NHS- oder PFP-Aktivesters von **43**. Diese Strategie wurde in Abschnitt 5.1.6 erfolgreich für die Synthese der HIPS-Fluorophore **59** und **61** eingesetzt. Mit einem PFP-Aktivester könnte die Amidbindung in wässriger Lösung am Harz gekuppelt werden.

Der letzte Schritt war die Reduktion des Disulfids **82** durch TCEP. Testreaktionen hatten zuvor gezeigt, dass das Abspalten der Schutzgruppe in Wasser mit TCEP unter quantitativen Ausbeuten möglich war.

6.1.8 Synthese von stabilisierten Yliden

Durch die Wittig-Reaktion^[104] können Carbonylverbindungen wie Aldehyde und Ketone mit Yliden zu Alkenen umgesetzt werden. Hierbei gilt, dass Aldehyde reaktiver sind als Ketone. Carbonsäureester sind gegenüber einer Wittig-Reaktion inert und insgesamt wird ein vielfältiges Spektrum an funktionellen Gruppen toleriert.^[105] Daher wurde die Wittig-Reaktion bereits für die N-terminale Funktionalisierung von Proteinen eingesetzt.^[108] Durch die Oxidation eines Serin-Restes mit Natriumperodat wurde ein N-terminaler Aldehyd erzeugt, welcher mit stabilisierten Yliden umgesetzt wurde.^[108] Die Wittig-Reaktion könnte somit eine bioorthogonale Konjugation mit dem Aldehyd von FGly ermöglichen.

Die benötigten Ylide können aus Triphenylphosphan und halogenierten Kohlenwasserstoffen hergestellt werden. In einer S_N2-Reaktion wird das Phosphoniumsalz gebildet, welche durch eine Base zum Ylid umgesetzt werden kann. Die Wahl der Base hängt hierbei von der Stabilität des Ylids ab. Ylide sind Salze mit einer benachbarten positiven und negativen Ladungen. Bei den Phosphonium-Yliden ist die positive Ladung am Phosphor und die negative Ladung am Kohlenstoffatom lokalisiert.^{[217][218]}

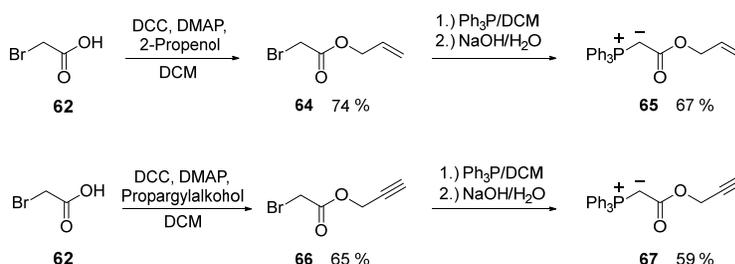


Abbildung 6-23 Synthese von stabilisierten Yliden **65** und **67**: Ausgehend von Bromessigsäure konnte die Carbonsäure durch eine Steglich-Veresterung funktionalisiert werden. Dann erfolgte die nukleophile Substitution mit Triphenylphosphan zum Phosphoniumsalz. Nach der Deprotonierung mit Natriumhydroxid wurden die Ylide **65** und **67** erhalten.

Ausgehend von Bromessigsäure **62** wurde die Carbonsäurefunktion in einer Steglich-Veresterung funktionalisiert.^[219] Der Siedepunkt von Allyl-bromacetat **64** beträgt 73 °C bei 1.33 mbar^[220] und Propargyl-bromacetat **66** hat einen Siedepunkt von 79 °C bei 1.33 mbar.^[220] Daher wurde eine Vakuumdestillation zur Reinigung der Rohprodukte durchgeführt. Die anderen Komponenten wie Dicyclohexylharnstoff besitzen einen deutlich höheren Siedepunkt, sodass die Ester **64** und **66** in hoher Reinheit isoliert werden konnten. Anschließend wurde in einer nukleophilen Substitution mit Triphenylphosphan das Phosphoniumsalz gebildet. Die Phosphoniumsalze können durch RP-HPLC gereinigt werden oder als Rohprodukt für die Folgereaktion eingesetzt werden. Abschließend wurde Natriumhydroxid für die Deprotonierung zu den stabilisierten Yliden **65** und **67** verwendet.^[108] Abbildung 6-23 zeigt die Syntheseroute für die Ylide **65** und **67**. In der Literatur wird Ylid **67** als rotes Öl beschrieben.^[108] In dieser Arbeit wurde das Produkt **67** jedoch als farbloser Feststoff isoliert. Nach der Deprotonierung zum Ylid **65** oder **67** wurde die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert und das isolierte Rohprodukt wurde direkt für die Umsetzung mit FGly-

Peptiden eingesetzt. Abbildung 6-24 zeigt repräsentativ das $^1\text{H-NMR}$ und $^{31}\text{P-NMR}$ Spektrum von Ylid **65**.

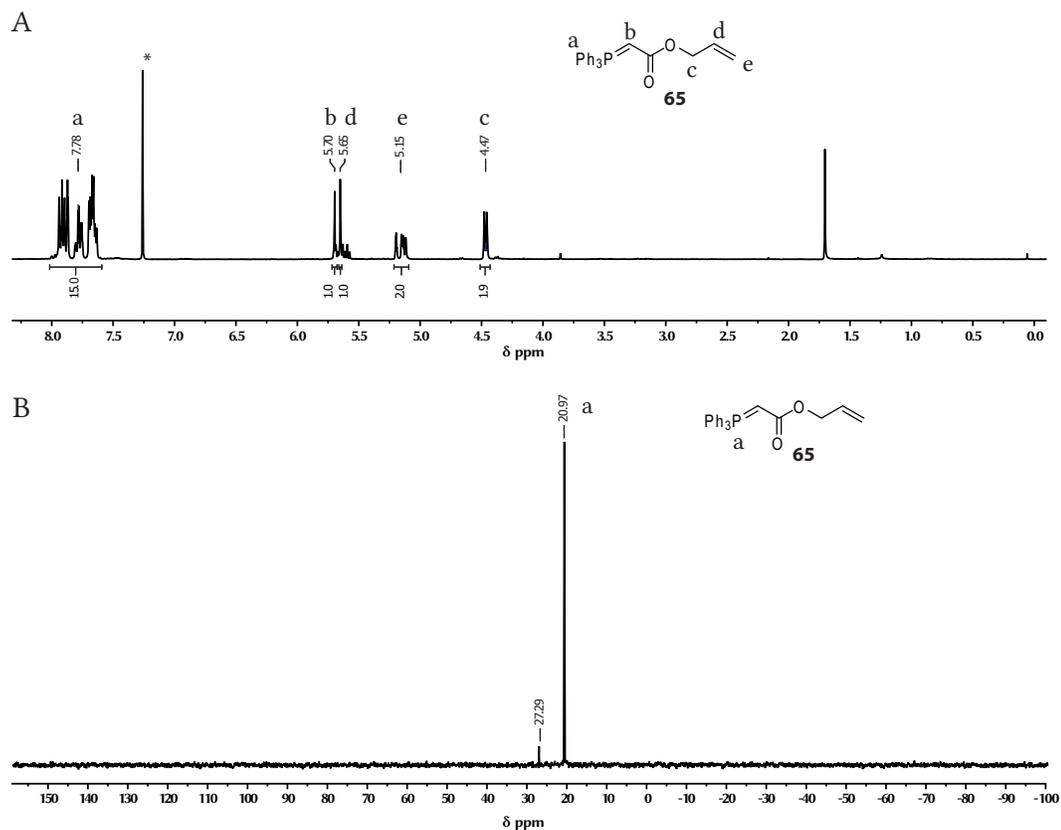


Abbildung 6-24 $^1\text{H-NMR}$ und $^{31}\text{P-NMR}$ Spektrum von Ylid **65** in CDCl_3 (*):

Die Signale im $^1\text{H-NMR}$ können dem Produkt zugeordnet werden. Das $^{31}\text{P-NMR}$ zeigt zwei Phosphor-Signale. Das Signal bei 20.97 ppm kann dem gewünschten Produkt zugeordnet werden und bei der Verunreinigung bei 22.39 ppm könnte es sich um Triphenylphosphin-Oxid handeln, dessen chemische Verschiebung in Toluol- d_8 bei 23 ppm liegt.^[221] Die Ylide **65** und **67** werden im Abschnitt 6.2.7 für die Konjugation mit FGly eingesetzt.

6.2 Darstellung von aldehydhaltigen Peptiden

Die Carbonylgruppe von Aldehyden ist aufgrund ihrer besonderen Reaktivität als Elektrophil hervorragend für bioorthogonale Reaktionen geeignet. Dies wurde in vorangehenden Arbeiten für die ortsspezifische Markierung, bioorthogonale Konjugation und orientierte Immobilisierung von Proteinen gezeigt.^{[2][171]} Dabei wird durch das C α -Formylglycin-generierende Enzym (FGE) die Seitenkette eines Cystein-Restes innerhalb der Konsensus-Sequenz (C-x/T-P-x/S-R) zum Aldehyd oxidiert.^[66] Das C α -Formylglycin-generierende Enzym (FGE) kommt sowohl in Prokaryoten^[77] als auch in Eukaryoten^[60] vor. Für diesen Teil der Arbeit sollten die FGEs aus *Homo sapiens* (AS 73-374, Δ FGE) und *Mycobacterium tuberculosis* (AS 2-299, mtbFGE) für die Synthese aldehydhaltiger Peptide verwendet und optimiert werden. Dabei sollten zunächst kürzere Modellpeptide synthetisiert und dann mit Δ FGE und mtbFGE umgesetzt werden. Die Synthese der Substratpeptide wurde in Abschnitt 6.1.1 beschrieben. Nach der Charakterisierung der aldehydhaltigen Peptide erfolgte die Umsetzung in Wittig-Reaktionen mit stabilisierten Yliden. Mit dieser Strategie könnten Peptide mit funktionellen Gruppen ausgestattet werden, die in der konventionellen Lösungssynthese bzw. Festphasensynthese nicht oder nur unter großem Schutzgruppenaufwand eingebaut werden können.

6.2.1 Expression und Reinigung von C α -Formylglycin-generierenden Enzymen

Für den Einsatz von FGE als Biokatalysator in der Peptidchemie wird ein robustes Protokoll für die Expression und Reinigung benötigt. Besonders wichtig ist hierbei, das Enzym in guten Ausbeuten und mit einer möglichst hohen katalytischen Aktivität nach der Reinigung zu erhalten, da für die präparative Umsetzung von Peptiden große Mengen an FGE benötigt werden. Unter diesem Gesichtspunkt wurde die Produktion von zwei FGE-Spezies optimiert, dem trunkierten eukaryotischen FGE aus *Homo sapiens* (AS 73-374, Δ FGE) und dem prokaryotischen FGE aus *Mycobacterium tuberculosis* (AS 2-299, mtbFGE).

Expression und Reinigung von Δ FGE

Vorausgehende Arbeiten zeigten, dass humanes FGE durch die Serinprotease Furin zwischen AS 72 und 73 gespalten wird. Durch gezielte Mutationen in der Furin-Signalsequenz ⁶⁹RYSR⁷² kann diese Prozessierung verhindert werden.^[72] E. Ennemann konnte während ihrer Promotion zeigen, dass die Produktion von flFGE (AS 34-374) in HT1080-Zellen möglich ist, wenn die Arginin-Reste Arg⁶⁹ und Arg⁷² gegen Alanin substituiert werden. Weiterhin ist die Expression von flFGE (AS 34-374) in CHO-Zellen durchführbar, wenn die Zellen für Furin defizient sind.^[222] Aufgrund der geringen Ausbeute an FGE aus konditioniertem Medium eignet sich diese Technik jedoch nicht für die Produktion von FGE für den Einsatz als Biokatalysator.

S. Alam konnte in seiner Dissertation zeigen, dass die Produktion von Δ FGE in *High Five*-Insektenzellen möglich ist.^[223] Darauf basierend wurde von M. Wachs und E. Ennemann die Reinigung von flFGE aus *High Five*-Insektenzellen etabliert.^[85] Da die N-terminale Domäne von flFGE für die Umsetzung von Peptiden *in vitro* nicht benötigt

wird, wird in dieser Arbeit Δ FGE eingesetzt. (Abschnitt 2.3) Der Vektor für die Expression in *High Five*-Insektenzellen wurde von K. Radhakrishnan und S. Alam zur Verfügung gestellt und die Entwicklung der Produktion und Reinigung für Δ FGE aus dem Insektenzellkulturüberstand orientierte sich an der Strategie von S. Alam.^{[82][223]} Neben guten Ausbeuten ermöglicht die Produktion von Δ FGE in Insektenzellen im Gegensatz zu der Expression in *E. coli* eine korrekte Faltung und Ausbildung von Disulfidbrücken sowie die Glykosylierung des Proteins.^[223]

Expression von Δ FGE in *High Five*-Insektenzellen

Die Expression von humanem Δ FGE wurde in *High Five*-Insektenzellen mit dem Baculovirus-Expressionssystem durchgeführt. Eine erste Infektion von *High Five*-Insektenzellen lieferte nach Reinigung mittels IMAC eine Ausbeute von 4.4 mg Δ FGE pro Liter Kulturmedium. Für eine hohe Expression ist die Anzahl an Virusinfektionen pro Zelle (MOI) entscheidend. Yamaji *et al.* konnten zeigen, dass eine Infektion mit einer hohen MOI (≥ 1) bessere Ausbeuten an Zielprotein liefert.^[224] Aufgrund der geringen Ausbeute an Zielprotein nach der ersten Transfektion, mit unbekannter MOI, wurde ein *plaque assay* mit abschließender Färbung durch Neutralrot etabliert. Mit dieser Technik wurde der Virustiter erfolgreich bestimmt. Der in SF9-Zellen produzierte Virus enthielt einen Titer von $1.47 \cdot 10^7$ pfu/mL. In einer weiteren Infektion von *High Five*-Insektenzellen wurde eine MOI von 1.5 eingesetzt. Nach Aufreinigung mittels IMAC konnte eine Ausbeute von 41 mg Δ FGE pro Liter Kulturmedium erreicht werden. Die Transfektion mit einer höheren MOI lieferte eine fast zehnfach höhere Ausbeute. Somit konnten die Ergebnisse von Yamaji *et al.* für die Produktion von Δ FGE bestätigt werden. Abbildung 6-25 zeigt die Vitalität und Zellzahl der *High Five*-Suspensionskultur nach der Transfektion mit dem Δ FGE-Baculovirus.

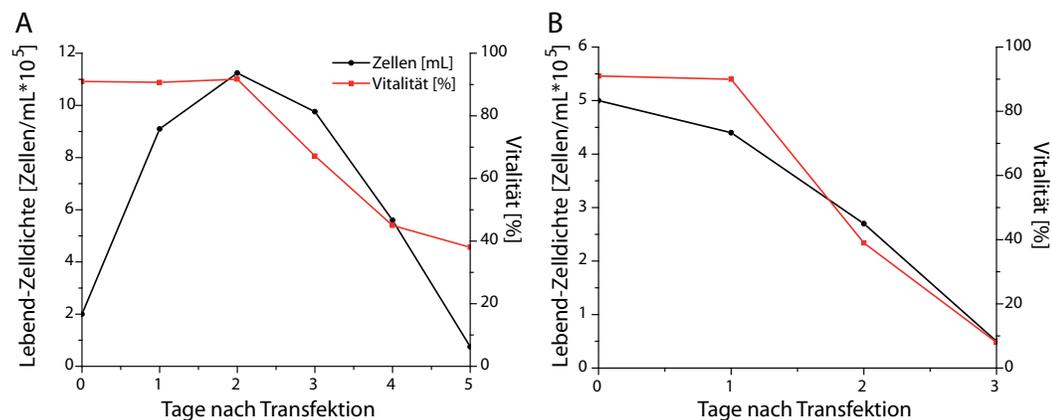


Abbildung 6-25 Zellzahl und Vitalität der *High Five*-Insektenzellen nach der Transfektion mit dem Δ FGE-Baculovirus: (A) In der ersten Transfektion wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL einer 200 mL *High Five*-Suspensionskultur mit 2 mL Virus infiziert. Die Zellzahl stieg nach der Transfektion weiter an und die Vitalität der Kultur sank nur langsam. Für Transfektion (B) wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL einer 300 mL *High Five*-Suspensionskultur mit einer MOI von 1.5 infiziert. Die Zellzahl stieg nach der Transfektion nicht weiter an und die Vitalität der Kultur sank deutlich, nach einigen Tagen Inkubation.

Für die erste Transfektion wurde eine zu geringe MOI eingesetzt. Nach der Transfektion stieg die Zellzahl deutlich an, was ein Hinweis darauf ist, dass nur sehr wenige Zellen mit dem Virus infiziert sind. Dies hatte zur Folge, dass die Nährstoffe im Medium von Zellen verbraucht werden, die nicht an der Produktion von Δ FGE beteiligt waren. Erst nach zwei Tagen sank die Vitalität der Kultur. Dies könnte daran gelegen haben, dass die Nährstoffe im Medium verbraucht waren. Daher wurde der Virustiter bestimmt und ein zweiter Transfektionsansatz (B) mit einer MOI von 1.5 durchgeführt. Hier kam es zu keiner weiteren Zellteilung, was zeigt, dass alle Zellen mit dem Virus infiziert waren. Bei einer optimalen Transfektion sollte die Zellzahl am ersten Tagen leicht steigen.^[224] Somit sollte für eine weitere Optimierung der Ausbeute an Δ FGE eine MOI zwischen 1 und 1.5 evaluiert werden und eine optimale Ausgangs Zelldichte etabliert werden. Insgesamt können durch die Expression in *High Five* Suspensionskultur sehr hohe Ausbeuten an Δ FGE erzielt werden.

Reinigung von Δ FGE durch IMAC-Affinitätschromatographie

Nach der Expression in *High Five*-Insektenzellen wurde das Medium gegen Tris-Bindpuffer dialysiert. Die Reinigung von Δ FGE wurde im ersten Schritt mittels IMAC-Affinitätschromatographie durchgeführt, für die eine Säule mit einer Ni^{2+} -Sepharose-Matrix eingesetzt wurde. Die Bindung an die stationäre Phase erfolgte über einen C-terminalen RGS-His₇-tag. Die Elution von Δ FGE erfolgte mit einer linear steigenden Imidazolkonzentration von 0 mM bis 500 mM. Abschließend wurden die Fraktionen der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit überprüft.

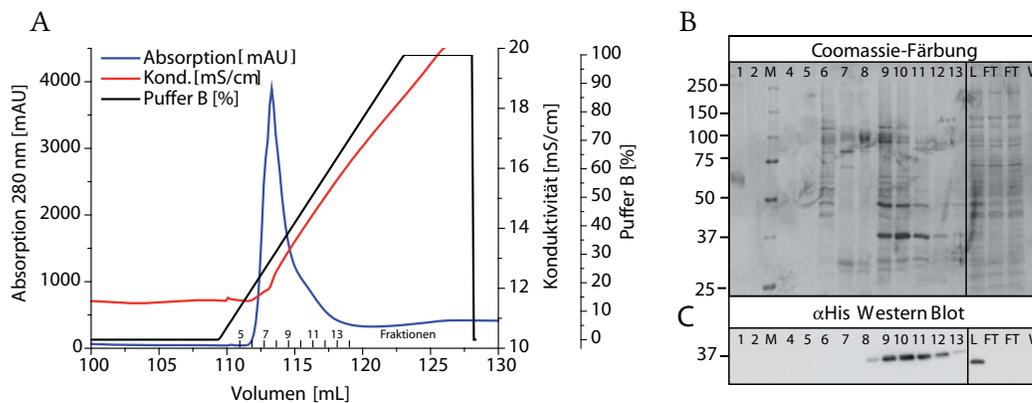


Abbildung 6-26 Analyse der Reinigung von Δ FGE: (A) Das Protein wurde über Ni^{2+} -Affinitätschromatographie mit einer HisTrap FF-Säule angereichert. Bei einem Elutionsbereich von 112 bis 118 mL, was einer Imidazolkonzentration von ca. 100 mM entspricht, ist ein scharfes Signal mit einer Schulter zu erkennen. Die Auftrennung der Proteine wurde unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE durchgeführt. (B) Analyse der Elutionsfraktionen mittels Coomassie-Färbung. (C) Der Western Blot wurde mit Hilfe eines RGS-His₆ Antikörpers entwickelt. In Spur L wurde das Medium vor der Anreicherung aufgetragen. In den Spuren FT wurde der Durchfluss und in Spur W die Waschfraktion analysiert (Je 45 μL für SDS-PAGE, 9 μL WB). In den Spuren 1-13 wurden die Fraktionen der Affinitätschromatographie aufgetrennt (Je 15 μL SDS-PAGE, 3 μL WB), wobei in den Fraktionen 9-12 die höchste Konzentration an Δ FGE detektiert wurde.

Parallel wurde durch einen Western Blot, der mit Hilfe eines RGS-His₆ Antikörpers entwickelt wurde, getestet, in welchen Fraktionen Δ FGE eluiert wurde. In Abbildung 6-26 wird exemplarisch die Effektivität der Proteinaufreinigung mittels IMAC-Affinitätschromatographie von Δ FGE aufgezeigt. Sowohl der Western Blot als auch die Coomassie-Färbung zeigen Banden bei 37 kDa, bei denen es sich um Δ FGE handelt. Δ FGE wurde in den Fraktionen 9-12 angereichert. Die Elution erfolgte ab einer Imidazolkonzentration von ca. 100 mM. Im Durchfluss können nur sehr geringe Mengen Δ FGE detektiert werden. Somit war die Bindung zwischen RGS-His₇-tag und Ni²⁺-Kationen erfolgreich. Jedoch zeigt die Coomassie-Färbung verschiedene Banden, die auf Verunreinigungen schließen lassen. Eine besonders abundante Verunreinigung ist bei 48 kDa zu erkennen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung, welche möglich ist, wenn native Proteine aus *E. coli* zwei oder mehr benachbarte Histidin-Reste aufweisen.^[225] Die Quantifizierung der Konzentration an angereichertem Δ FGE erfolgte densitometrisch durch die Software ImageJ. Die Fraktionen 8 bis 13 enthielten insgesamt 880 μ g Δ FGE. Somit liegt die Ausbeute bei 4.4 mg pro Liter Kulturmedium. Die Anreicherung von Δ FGE aus Insektenzellkulturüberständen durch Dialyse und folgender IMAC-Affinitätschromatographie ist grundsätzlich möglich, jedoch ist die Reinheit von Δ FGE nicht ausreichend für eine exakte Bestimmung der katalytischen Aktivität und den Einsatz als Biokatalysator in der Peptidchemie.

Reinigung von Δ FGE durch Größenausschlusschromatographie

Im nächsten Schritt wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt, um die Verunreinigungen abzutrennen, welche nach der Ni²⁺-Affinitätschromatographie noch in den Eluaten vorhanden waren. Weiterhin kann durch die SEC untersucht werden, ob Δ FGE als Monomer und Dimer vorliegt. M. Wachs konnte zeigen, dass bei der Reinigung von flFGE eine monomere und eine dimere Form von flFGE durch die SEC isoliert werden können.^[85] Es wurde eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule verwendet, die eine effiziente Trennung von Proteinen im Bereich von 10-600 kDa erlaubt. Für die in Abbildung 6-27 gezeigte SEC wurden 880 μ g Δ FGE eingesetzt. Nachdem die Fraktionen 13-15 vereinigt wurden, konnten 630 μ g Δ FGE erhalten werden. Dies entspricht einer Wiederfindungsrate von 72%. Der Vergleich des Chromatogramms (A) und des Coomassie-gefärbten Gels (B) zeigt, dass die Verunreinigungen, welche durch die Reinigung mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie nicht entfernt werden konnten, mit Hilfe der SEC erfolgreich abgetrennt wurden. Die Signale von 8-14 mL resultieren von den höhermolekularen Verunreinigungen und das scharfe Signal bei 15 mL von Δ FGE.

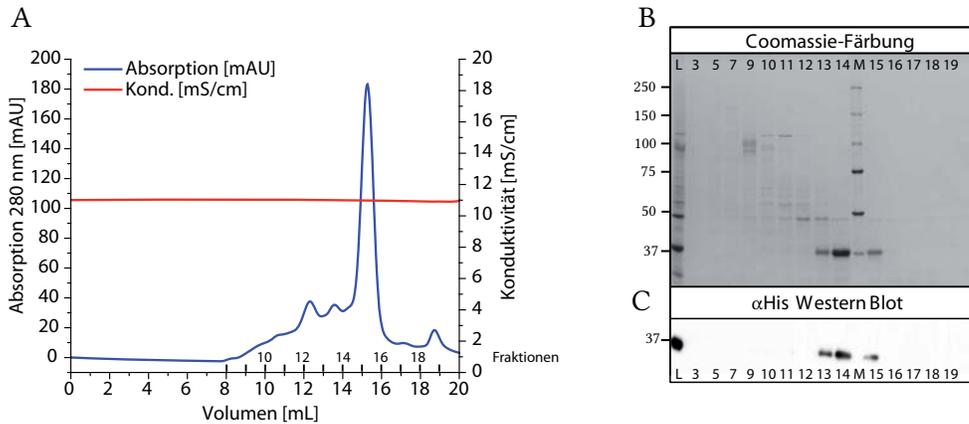


Abbildung 6-27 Analyse der Reinigung von Δ FGE durch SEC: Zur weiteren Anreicherung von Δ FGE wurden die Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie konzentriert und unter Verwendung der Superdex 200 10/300 GL-Säule gereinigt. (A) Die UV-Absorption und die Leitfähigkeit sind im Chromatogramm dargestellt. Bei 15 mL ist ein scharfes Signal zu erkennen. Die korrespondierenden Fraktionen 13-15 enthielten Δ FGE in guter Reinheit. (B) Im Coomassie-gefärbten Gel nach SDS-PAGE wurden die erhaltenen Elutionsfraktionen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. (C) Der Western Blot wurde mit einem RGS-His₆ Antikörper entwickelt. In Spur L wurden die konzentrierten Fraktionen nach Affinitätschromatographie analysiert. Die Spuren 3-19 zeigen die Fraktionen der SEC.

Während der Anreicherung von Δ FGE mittels SEC konnten keine Hinweise auf ein Dimer gefunden werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die SEC als weiteren Anreicherungsschritt Δ FGE in sehr hoher Reinheit und Ausbeute isoliert werden konnte.

Separation verschiedener Konformationen von Δ FGE durch IEC

In der Ionenaustauschchromatographie (IEC) werden Proteine nach ihrer Nettoladung separiert. Für die Anionenaustauschchromatographie (AEC) wird als stationäre Phase ein quartäres Amin eingesetzt wodurch negativ geladene Proteine an das Säulenmaterial binden. Der isoelektrische Punkt von Δ FGE unter Einberechnung des RGS-His₇-tags beträgt 6.39 und für die AEC sollte der pH-Wert des Puffers mindestens 1 pH Einheit über dem pI des Zielproteins liegen. Daher wurde die AEC bei einem pH-Wert von 8.0 durchgeführt und es wurde die Säule Resource Q 1 mL verwendet. S. Alam konnte durch eine Anionenaustauschchromatographie (AEC) zwei verschiedene, monomere FGE-Populationen separieren, welche verschiedene spezifische Aktivitäten aufwiesen.^[223]

Da für den Einsatz von FGE in der Peptidsynthese möglichst hohe Aktivitäten benötigt werden, wurde ebenfalls eine AEC durchgeführt, um die Aktivität der beiden Populationen zu untersuchen. Die Fraktionen 13 bis 15 der SEC wurden vereinigt und mit Bindepuffer verdünnt. Die Elution von Δ FGE erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 bis 1 M) über 20 x Säulenvolumen (CV). In Abbildung 6-28 ist das Chromatogramm der AEC sowie die dazugehörige Western Blot-Analyse unter reduzierenden Bedingungen dargestellt. Die Bindung von Δ FGE war erfolgreich, da in der Analyse des Durchflusses und des Waschschrittes keine Bande für Δ FGE detektiert

werden konnte. In den Fraktionen 2-4 wurde die höchste Konzentration an Zielprotein nachgewiesen. Der Vergleich mit dem Chromatogramm zeigt, dass das erste Signal in Fraktion 2 und das zweite Signal in Fraktion 3 separiert wurden. Ein weiteres Signal wurde in Fraktion 4 erhalten. Die Elution von Fraktion 2 erfolgte bei einer Salzkonzentration von 175 mM und Fraktion 3 bei 225 mM. Alle drei Signale zeigen eine scharfe Bande bei 37 kDa in der Coomassie-Färbung und im Western Blot. Somit handelt es sich bei allen drei Populationen um Δ FGE. Fraktion 2 enthielt 82 μ g Δ FGE und Fraktion 3 363 μ g Δ FGE. Für die Reinigung wurden 630 μ g Δ FGE eingesetzt, somit liegt die Ausbeute der AEC bei 70 %

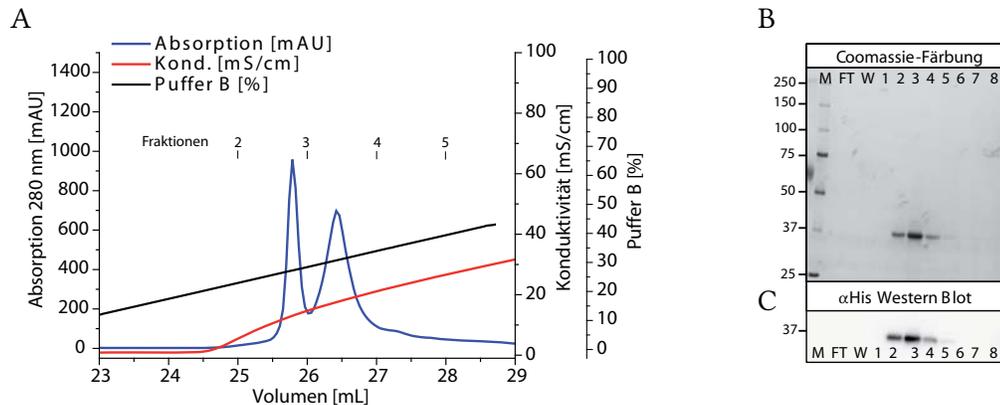


Abbildung 6-28 Analyse der Reinigung von Δ FGE durch AEC: Zur Untersuchung der verschiedenen Populationen von Δ FGE bezüglich ihrer katalytischen Aktivität wurde eine Reinigung mit einer Resource-Q 1 mL Säule durchgeführt. Die Fraktionen der SEC wurden mit Bindepuffer verdünnt und direkt auf die Säule geladen. Nach der Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M NaCl konnten, wie im Chromatogramm (A) zu erkennen ist, Fraktionen mit verschiedenen Δ FGE-Formen erhalten werden. Die Analyse der Fraktionen erfolgte nach SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen in einer (B) Coomassie-Färbung und (C) mit Hilfe eines Western Blots, welcher mit einem RGS-His₆ Antikörpers entwickelt wurde. Der Durchfluss (FT) und die Waschfraktion (W) enthielten kein Δ FGE. In den Fraktionen 2 bis 4 konnte bei 37 kDa Δ FGE detektiert werden.

Die spezifische Aktivität beider Fraktionen wurde unter Standardbedingungen (Abschnitt 5.2.5) für das Peptid CS1 ermittelt. Fraktion 2 besitzt eine höhere spezifische Aktivität von 93.4 mU mg⁻¹, im Vergleich zu Fraktion 3 mit 59.9 mU mg⁻¹. Die Ursache für die verschiedenen Formen von humanem FGE ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine Möglichkeit wäre, dass es sich um verschiedene Redoxformen des Enzyms handelt.^[226] Knop *et al.* und Holder *et al.* berichten eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivität *in vitro* in Anwesenheit von Kupfer-Ionen.^{[22][17][20]} Dies wäre ein weiterer Ansatz, um die beiden Fraktionen mit verschiedenen katalytischen Aktivitäten zu erklären. Bei Fraktion 3 könnte es sich um das Apoenzym mit einer geringen Kupfer-Besetzung handeln und bei Fraktion 2 um Δ FGE mit gebundenen Kupfer-Ionen.

Insgesamt war die zweischrittige Reinigung von Δ FGE durch IMAC und SEC erfolgreich und im dritten Reinigungsschritt konnte eine Population an hoch aktivem

Δ FGE isoliert werden. Für die Zielsetzung dieser Arbeit ist die bisher beschriebene Reinigungsstrategie unter Berücksichtigung der Verluste bei dem zusätzlichen Reinigungsschritt jedoch zu aufwendig. Daher wurde in weiteren Aufreinigungen auf die AEC verzichtet. Beide Fraktionen zeigten eine katalytische Aktivität und eine Trennung der Δ FGE-Formen ist für die Synthese von aldehydhaltigen Peptiden nicht notwendig.

Reinigung von Δ FGE mit Ni^{2+} Sepharose im *batch*-Verfahren

Um die Reinigung von Δ FGE aus dem Medium der *High Five*-Suspensionskultur zu vereinfachen, wurde eine Anreicherung mittels Ni^{2+} Sepharose im *batch*-Verfahren erprobt. Wie bei der IMAC-Affinitätschromatographie bindet der RGS-His₇-tag an die Ni^{2+} Sepharose-Matrix. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass keine Dialyse des Mediums notwendig ist und die Ni^{2+} Sepharose direkt in das Medium gegeben werden kann. Nach einer Inkubation von drei Stunden werden Medium und Ni^{2+} Sepharose durch Zentrifugation getrennt und unspezifisch gebundene Proteine können durch Waschschriffe entfernt werden. In Abbildung 6-29 wird exemplarisch die Effektivität der Proteinaufreinigung von Δ FGE mittel Ni^{2+} Sepharose im *batch*-Verfahren gezeigt. Die Coomassie-Färbung zeigt Banden bei 37 kDa, bei denen es sich um Δ FGE handelt. In den Fraktionen E1 bis E5 lag die höchste Konzentration an Δ FGE vor. Im Durchfluss (FT) können, im Gegensatz zum parallel aufgetragenen Medium vor der Anreicherung (L), nur sehr geringe Mengen Δ FGE detektiert werden. Somit war die Bindung zwischen RGS-His₇-tag und Ni^{2+} -Kationen erfolgreich. Für die Waschschriffe W2-W4 wurde eine Imidazolkonzentration von 5 mM verwendet. Bei dieser Konzentration wurden hauptsächlich unspezifisch gebundene Verunreinigungen eluiert. Ab einer Imidazolkonzentration von 10 mM in Waschschriff W5 erfolgte die Elution von Δ FGE. Für die weitere Elution wurde eine Imidazolkonzentration von 250 mM eingesetzt.

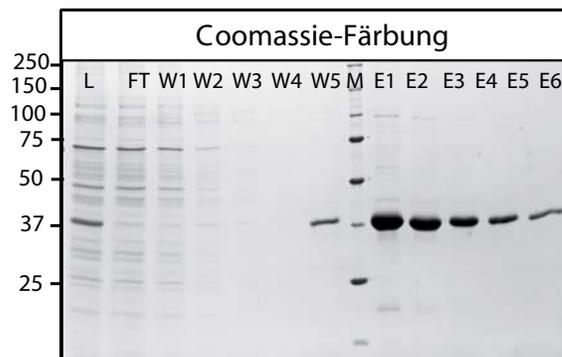


Abbildung 6-29 Reinigung von Δ FGE mittels Ni^{2+} Sepharose im *batch*-Verfahren: Die Auftrennung der Proteine wurde unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE durchgeführt und die Proteine wurden durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. In Spur L wurde das Medium vor der Anreicherung aufgetragen. In der Spur FT wurde der Durchfluss und in den Spuren W1-W5 die Waschfraktionen analysiert. In den Spuren E1-E5 wurden die Fraktionen des *batch*-Verfahrens untersucht. W5 sowie E1 bis E5 zeigen eine deutliche Bande bei 37 kDa. Diese Fraktionen enthalten Δ FGE in hoher Reinheit.

Der Vergleich zwischen IMAC-Affinitätschromatographie und IMAC im *batch*-Verfahren zeigt, dass die Interaktion zwischen RGS-His₇-tag und stationärer Phase bei der HisTrap FF Säule deutlich stärker ist. Eine zehnfach höhere Imidazolkonzentration wurde für die Elution benötigt. Im *batch*-Verfahren eluierte ΔFGE bereits bei 10 mM Imidazol im fünften Waschschrift, wie an der schwachen Bande bei 37 kDa zu erkennen ist. Daher wurden die Ni²⁺-Sepharose-*beads* bei folgenden Reinigungen nur noch mit maximal 5 mM Imidazol gewaschen. Bei der IMAC-Affinitätschromatographie konnten verschiedene andere Verunreinigungen wie z.B. das Protein bei 48 kDa mit einer hohen Affinität an die Säule binden. Dies war beim *batch*-Verfahren nicht der Fall. Das 48 kDa-Protein ist ausschließlich im Durchfluss und der ersten Waschfraktion zu finden. Insgesamt konnte ΔFGE in hoher Reinheit und einer guten Ausbeute von 41 mg pro Liter Kulturmedium erhalten werden. Somit ist die effektive Expression in Insektenzellen und die folgende unkomplizierte 1-Schritt-Reinigung im *batch*-Verfahren ideal für die Gewinnung von ΔFGE als Biokatalysator für die Peptidchemie.

Expression und Reinigung von mtbFGE

Neben humanem FGE existieren verschiedene prokaryotische Homologe wie z.B. aus *Mycobacterium tuberculosis* (mtbFGE),^[70] welche ebenfalls für die posttranslationale Oxidation eines Cystein-Restes in Typ-I-Sulfatasen verantwortlich sind. Das aktive Zentrum von mtbFGE enthält keine sterisch anspruchsvollen Aminosäuren und toleriert daher Sequenzabweichungen im Substrat besser als andere prokaryotische Homologe wie scFGE.^[70] Aus diesem Grund wurde mtbFGE für diese Arbeit gewählt. Das Plasmid für die Expression in *E. coli* wurde von D. Rabuka zur Verfügung gestellt.^[70] Zunächst wurde die Expression in *E. coli* optimiert, um hohe Ausbeuten an Enzym zu produzieren.

Im Vergleich zwischen mtbFGE und humanem FGE finden sich drei signifikante Haupt-Unterschiede. Nur humanes flFGE verfügt über die N-terminale Domäne (AS 34-72).^[72] Desweiteren unterscheiden sich die beiden Enzyme in der Zahl an gebundenen Ca²⁺-Kationen. Humanes FGE verfügt über zwei Ca²⁺-Bindestellen, im Gegensatz dazu enthält FGE aus *M. tuberculosis* keine Ca²⁺-Bindestelle.^{[77][74]} Der dritte Unterschied liegt in den Cystein-Resten. Nur im humanen FGE sind die strukturellen Disulfidbrücken zwischen Cys²¹⁸ (3) und Cys³⁶⁵ (C8) sowie Cys²³⁵ (4) und Cys³⁴⁶ (C7) zu finden. In Prokaryoten ist FGE im Cytosol ansässig, wo reduzierende Bedingungen anzutreffen sind.^[17] Diese Unterschiede lieferten die Motivation, die initiale Reinigung nach dem gleichen Protokoll wie für ΔFGE durchzuführen um die Unterschiede zu analysieren. Im ersten Schritt wurde eine IMAC durchgeführt, um das Protein anzureichern. Dann folgte eine SEC zur Abtrennung letzter Verunreinigungen. Weiterhin konnte durch die SEC untersucht werden, ob mtbFGE wie flFGE als Dimer und Monomer vorliegt. Im dritten Schritt wurde eine AEC durchgeführt. Da mtbFGE im Cytosol lokalisiert ist und über keine strukturellen Disulfidbrücken verfügt, sollte durch die AEC nur eine Enzym-Population isoliert werden.^[85]

Expression von mtbFGE in *E. coli*

Erste Experimente zeigten, dass ein hoher Anteil von mtbFGE in Einschlusskörperchen als Proteinaggregat vorliegt. Daher wurde untersucht, unter welchen Bedingungen die besten Ausbeuten an löslichem Enzym produziert werden können. Hierfür wurde der Einfluss der Temperatur bei Induktion mit IPTG analysiert. Weiterhin wurde überprüft ob, die Koexpression von Chaperonen wie groES/groEL die Proteinaggregation beeinflusst.^[227] Es wurde das Plasmid pGro7 von *Takara Bio. Inc.* verwendet, welches groES und groEL unter Kontrolle eines araB-Promotors enthält.^[228]

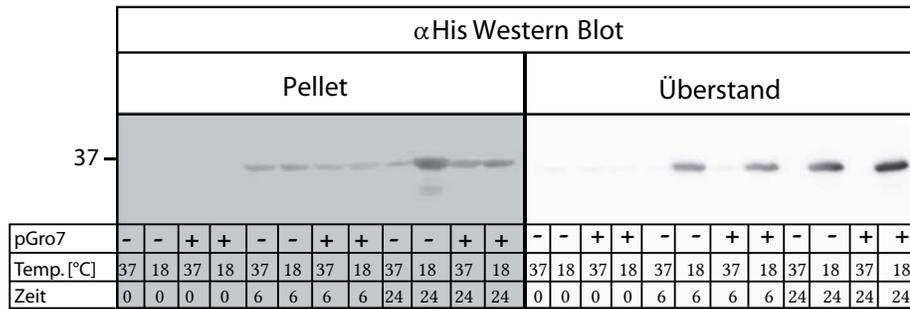


Abbildung 6-30 Western Blot Analyse der verschiedenen Expressionsbedingungen für mtbFGE: Es wurden vier 50 mL *E. coli* Kulturen verwendet. In zwei der Kulturen erfolgte die Koexpression mit pGro7. Weiterhin wurden 18°C und 37°C für die Induktion mit IPTG und die Proteinexpression evaluiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und durch Ultraschall lysiert. Nach Trennung von Pellet und Überstand durch Zentrifugation wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein des Überstandes per SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Western Blot wurde mit einem His₆-Antikörper entwickelt.

Abbildung 6-30 zeigt die Western Blot Analyse unter verschiedenen Expressionsbedingungen. Deutlich ist zu erkennen, dass im Pellet bei allen untersuchten Bedingungen Proteinaggregate vorliegen. Im Überstand wurde der Anteil an löslichem Protein analysiert. Es zeigte sich, dass die Temperatur bei der Induktion eine entscheidende Rolle spielt. Nach einer Induktion und Proteinexpression bei 37°C konnte kein lösliches Protein detektiert werden. Im Vergleich dazu lieferte die Induktion bei 18°C eine deutliche Proteinexpression, die im Verlauf der Expression ansteigt. Nach 24 Stunden wird die höchste Konzentration an mtbFGE erhalten. Nach diesem Zeitpunkt konnte keine weitere Zunahme der Proteinkonzentration beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wirkt sich eine zu lange Inkubationszeit negativ auf die Aktivität eines Proteins aus und es kann zu einer Degradation kommen.^[229]

Der Vergleich der Proben bei 18°C nach 24 Stunden Proteinexpression zeigt, dass durch die Koexpression mit pGro7 mehr lösliches mtbFGE erhalten wird. Jedoch ist das Wachstum der *E. coli* Kultur deutlich langsamer und es werden bei Koexpression mit pGro7 geringere Zelldichten erhalten. Da für die Western Blot Analyse eine gleichbleibende Menge an Gesamtprotein verwendet wurde, ist durch diese Daten keine Einschätzung möglich, ob die Koexpression mit pGro7 höhere Ausbeuten liefert. Daher wurden zwei ein-Liter-Kulturen parallel mit und ohne pGro7 kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0.6 und die Proteinexpression wurde bei 18°C durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden beide Kulturen lysiert und durch IMAC-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach der Koexpression mit pGro7 wurden 23 mg

mtbFGE isoliert, durch die Expression von mtbFGE ohne pGro7 wurde eine Ausbeute von 27 mg erzielt. Bei der Bildung von Proteinaggregaten hat sich neben der Koexpression von Chaperonen ebenfalls die Fusion mit einem gut löslichen Partner wie der Glutathion-S-Transferase (GSH) oder dem Maltose-bindenden Protein (MBP) als hilfreich erwiesen.^[230] Für zukünftige Experimente könnten Fusionsproteine erzeugt werden, um die Bildung von Einschlusskörperchen zu minimieren.

Durch die Induktion und Proteinexpression bei 18 °C können sehr gute Ausbeuten an mtbFGE produziert werden. Die Koexpression mit pGro7 erhöht den Anteil an löslichem Protein, jedoch ist die absolute Ausbeute an Zielprotein geringer, da niedrigere Zelldichten während der Kultivierung erreicht werden. Somit wurden die weiteren Expressionen bei 18 °C ohne Koexpression eines Chaperons durchgeführt.

Reinigung von mtbFGE durch IMAC-Affinitätschromatographie

Um einen direkten Vergleich zwischen Δ FGE und mtbFGE zu ermöglichen, wurde das Protokoll (IMAC, SEC, AEC) für die Reinigung von mtbFGE angewendet. Als stationäre Phase wurde eine HisTrap 1 mL Säule mit Ni²⁺-Sephrose eingesetzt. Die Elution von mtbFGE erfolgte mit einer steigenden Imidazolkonzentration von 0 bis 250 mM. Abschließend wurden die Bestandteile der Fraktionen der Ni²⁺-Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit überprüft.

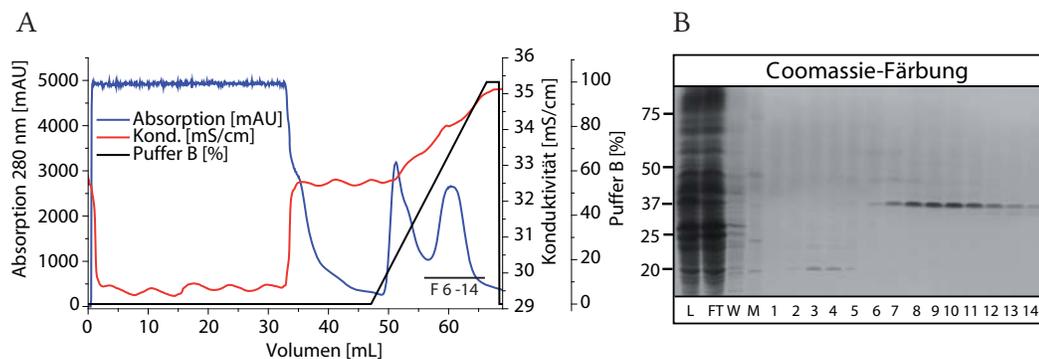


Abbildung 6-31 Analyse der Reinigung von mtbFGE: (A) Das Protein wurde über Ni²⁺-Affinitätschromatographie angereichert. Von 57 bis 65 mL ist ein scharfes Signal zu erkennen. Die Imidazolkonzentration beträgt bei 57 mL ca. 130 mM. Das Maximum des Signals liegt bei Fraktion 9 und 10. Ein weiteres Signal von 50 bis 57 mL eluiert bei geringeren Imidazolkonzentrationen und enthält Verunreinigungen. Die Auftrennung der Proteine wurde unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE durchgeführt. (B) Die Proteine wurden durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. In Spur L wurde das Lysat vor der Anreicherung aufgetragen. In den Spuren FT wurde der Durchfluss und in Spur W die Waschfraktion analysiert. In den Spuren 1-14 wurden die Fraktionen der Affinitätschromatographie aufgetrennt. In den Fraktionen 7-13 konnte die höchste Konzentration an mtbFGE detektiert werden.

In Abbildung 6-31 wird exemplarisch die Effektivität der Proteinaufreinigung mittels IMAC-Affinitätschromatographie von mtbFGE aufgezeigt.

Die Coomassie Färbung zeigt Banden unter 37 kDa, bei denen es sich um mtbFGE handelt. In den Fraktionen 7 bis 13 lag die höchste Konzentration an mtbFGE in sehr hoher Reinheit vor. Die Elution erfolgte ab einer Imidazolkonzentration von ca. 130 mM. Im Vergleich dazu eluieren die Verunreinigungen deutlich früher, bei 50 mL und einer Imidazolkonzentration von ca. 35 mM. Die Bindung der Verunreinigungen an die Ni²⁺-Sepharose lässt sich dadurch erklären, dass *E. coli* verschiedene Proteine exprimiert, die aufgrund einer Metallionen-Bindestelle oder mehrerer benachbarter Histidin-Reste an ihrer Oberfläche unspezifisch mit der stationären Phase der IMAC interagieren.^[231]

Die Identität von mtbFGE wurde durch einen tryptischen Verdau mit anschließender Analyse der tryptischen-Peptide mittels MALDI-ToF-MS bestimmt. Der Abgleich mit der NCBI-Datenbank ergab, dass die tryptischen Peptide die größte Übereinstimmung mit dem hypothetischen Protein RV0712 aus *Mycobacterium tuberculosis* Stamm H37Rv mit einem Mascot Score von 102 aufweisen. Es konnten 12 Peptide mit der Sequenz des Proteins abgeglichen werden, und diese deckten insgesamt 42% der Sequenz ab. Diese Daten zusammengenommen belegen, dass es sich bei dem analysierten Protein um FGE aus *Mycobacterium tuberculosis* handelt. Weiterhin wurde die Molmasse durch eine MALDI-ToF-MS Messung im Linearmodus bestätigt.

Die Ausbeute an mtbFGE wurde mittels eines Bradford-Assays bestimmt und lag bei 27 mg pro Liter Kulturmedium. Da hohe Ausbeuten und eine gute Reinheit erreicht wurden, eignet sich das beschriebene Protokoll für die Produktion von mtbFGE.

Reinigung von mtbFGE durch Größenausschlusschromatographie

Im nächsten Schritt wurde eine SEC durchgeführt um zu untersuchen, ob mtbFGE ausschließlich als Monomer oder wie flFGE auch als Dimer vorliegt.^[85] Dazu wurden 3.37 mg der vereinigten Fraktionen aus der IMAC über die Säule Superdex 200 10/300 GL aufgetrennt. Die Elution erfolgte isokratisch. Das Chromatogramm der Reinigung ist in Abbildung 6-32 dargestellt und zeigt ein scharfes Signal mit einer sehr kleinen Schulter. Bei der Schulter könnte es sich um restliche Verunreinigungen handeln, welche nicht durch die IMAC abgetrennt werden konnten. Die geringe Intensität dieser Schulter bestätigt die hohe Reinheit des Proteins nach der IMAC.

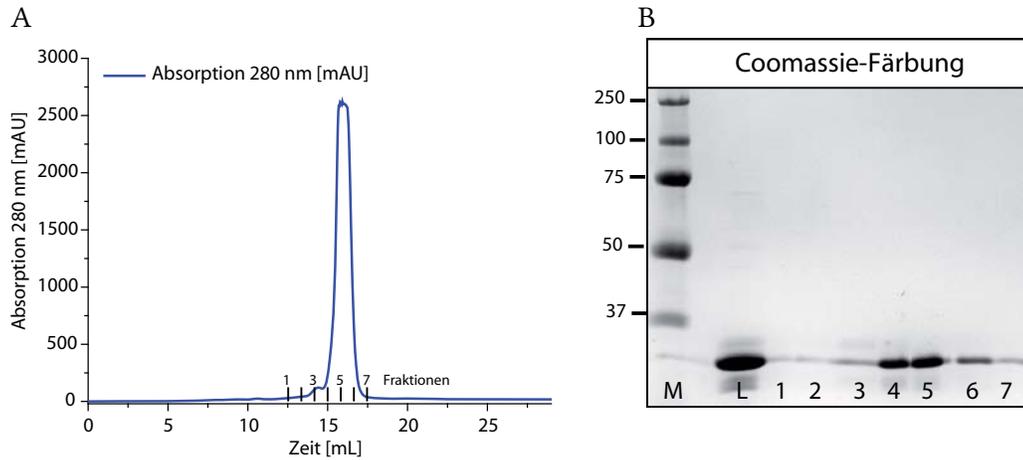


Abbildung 6-32 SEC von mtbFGE: (A) zeigt das Chromatogramm der SEC von mtbFGE. Für die Reinigung wurde die Säule Superdex 200 10/300 GL eingesetzt. Die Elution der Proteine erfolgte isokratisch. Bei 15 bis 17 mL ist ein scharfes Signal zu erkennen. (B) Die Analyse der Fraktionen durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit abschließender Coomassie Färbung zeigt, dass mtbFGE in hoher Reinheit in den Fraktionen 3-6 erhalten wurde.

Da größere Moleküle zuerst eluieren, während kleinere Moleküle in den Poren zurückgehalten werden, müssten Dimer und Monomer je ein Signal zeigen. In dem Chromatogramm der SEC ist nur ein Signal zu erkennen, dessen Retentionszeit für ein kleineres Molekül spricht. Somit liegt mtbFGE ausschließlich als Monomer vor. Das Coomassie-Gel zeigt für die Elutionsfraktionen eine Bande unterhalb von 37 kDa, bei der es sich um mtbFGE handelt, wobei das Protein hauptsächlich in den Fraktionen 4 und 5 enthalten war und ein geringerer Teil in Fraktion 4 und 6. Diese Fraktionen entsprechen einem Retentionsvolumen von 15 bis 17 mL. Die Ausbeute an mtbFGE wurde durch Densitometrie bestimmt und betrug 3.14 mg mtbFGE, was einer Wiederfindungsrate von 93% entspricht.

Reinigung von mtbFGE durch Ionenaustauschchromatographie

Durch die IEC werden Proteine nach ihrer Nettoladung separiert. Der isoelektrische Punkt von mtbFGE unter Einberechnung des His₆-tags beträgt 6.19.^[232] Da bei der AEC der pH-Wert oberhalb des IP liegen muss, wurde die Trennung bei einem pH-Wert von 8.0 unter Nutzung eines Anionenaustauschers durchgeführt. Als stationäre Phase diente die Säule Resource Q. Es wurden 3.2 mg mtbFGE aus der IMAC für diese Analyse verwendet. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M NaCl über 20 mL. Das Chromatogramm der Reinigung sowie die Analyse durch Silberfärbung und Western Blot ist in Abbildung 6-33 dargestellt. Die Silberfärbung zeigt eine Bande unter 37 kDa, die mit Hilfe des Western Blots mtbFGE zugeordnet werden konnte. Die Fraktionen 9 bis 13 enthielten die höchste Konzentration von mtbFGE und das Maximum des Signals liegt bei einem Elutionsvolumen von 14.5 mL. Die Gesamtausbeute wurde durch Densitometrie bestimmt und lag bei 3.47 ± 0.28 mg. Es wurden 3.2 mg mtbFGE auf die Säule aufgetragen. Dieser Wert liegt innerhalb der Standardabweichung für die berechnete Ausbeute, daher kann eine vollständige

Rückgewinnung des eingesetzten mtbFGE angenommen werden. Im Durchfluss und der Waschfraktion ist keine Bande für mtbFGE zu erkennen, dies verdeutlicht, dass die Wiederfindungsrate quantitativ ist.

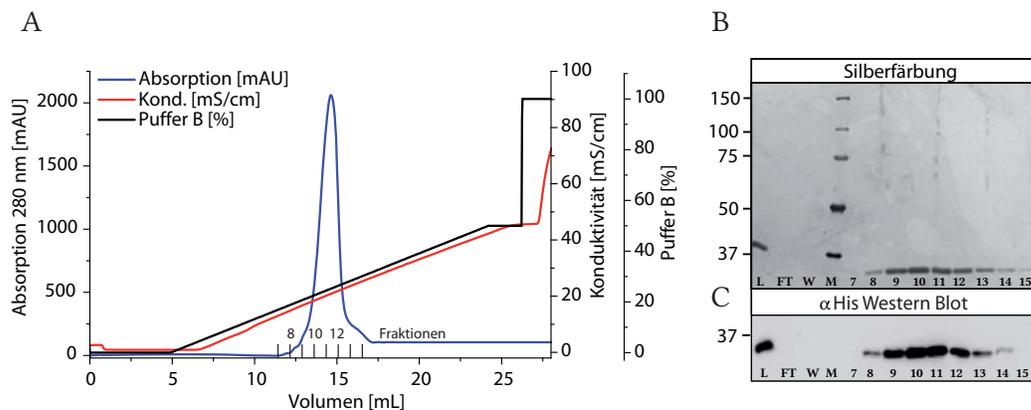


Abbildung 6-33 AEC von mtbFGE: Das Chromatogramm der AEC (A) zeigt ein scharfes Signal mit einem Maximum bei 14.5 mL. Für die Analyse wurde die Säule Resource Q verwendet. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl Gradienten von 0 bis 1 M. Ab einer Salzkonzentration von 400 mM erfolgte die Elution des Zielproteins. Nach SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen erfolgte eine Silberfärbung (B) oder die Analyse mittels Western Blot (C). Der Blot wurde mit einem His₆-Antikörper entwickelt. Es ist eine deutliche Bande unter 37 kDa zu erkennen, welche mtbFGE zugeordnet werden kann. Im Durchfluss (FT) und der Waschfraktion (W) konnte kein mtbFGE detektiert werden.

Das Chromatogramm der AEC zeigt ein scharfes Signal und lieferte keinen Hinweis auf die Existenz verschiedener mtbFGE-Populationen. Um diese Beobachtung zu validieren, wurde zusätzlich eine Western-Blot-Analyse der Fraktionen der AEC unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Abbildung 6-34 zeigt in den Fraktionen 9 bis 13 eine scharfe Bande, die mtbFGE zugeordnet werden kann, auch in dieser Analyse konnten keine verschiedenen Populationen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurden bei der Reinigung von Δ FGE durch AEC unter den gleichen Bedingungen (Abschnitt 6.2.1) zwei Signale erhalten. Die beiden Elutionsfraktionen der Signale enthielten je eine Δ FGE Population, welche sich in ihrer katalytischen Aktivität unterschieden. Ähnliche Beobachtungen wurden von M. Wachs für fFGE gemacht.^[85] Im Gegensatz zum humanen FGE scheint somit das FGE aus *Mycobacterium tuberculosis* nicht in unterschiedlichen Konformationen mit verschiedenen katalytischen Aktivitäten vorzuliegen.

Eine mögliche Erklärung liefert die Lokalisierung der Enzyme. Das ubiquitär exprimierte humane FGE ist im ER lokalisiert.^[60] In diesem Kompartiment liegt ein höherer Anteil an oxidiertem Glutathion vor, um Proteinen die Ausbildung von Disulfidbrücken zu ermöglichen.^[233] Das Redoxpotential liegt bei -170 bis -185 mV.^[234] Die Kristallstrukturanalyse von humanem FGE zeigt, dass die Cystein-Reste Cys²¹⁸ und Cys³⁶⁵ sowie Cys²³⁵ und Cys³⁴⁶ Disulfidbrücken ausbilden.^[73] Bei den zwei isolierten Populationen an Δ FGE könnte es sich somit um FGE Varianten mit einem anderen Muster an Disulfidbrücken oder einem anderen Reduktionsgrad handeln. Im Vergleich hierzu enthalten Prokaryoten keine membranbegrenzten Organellen wie das

endoplasmatisches Retikulum.^[235] Der periplasmatische Raum bietet in Gram-negativen Bakterien einen Ort für die Ausbildung von Disulfidbrücken,^[236] im Cytosol liegen jedoch vorwiegend reduzierende Bedingungen vor.^[237] Somit ist es möglich, dass mtbFGE über keine Disulfidbrücken verfügt und somit nur ein Redoxzustand nach der Expression in *E. coli* möglich ist. Alle acht Cysteine könnten als Thiol vorliegen und somit wäre nur eine Variante möglich.

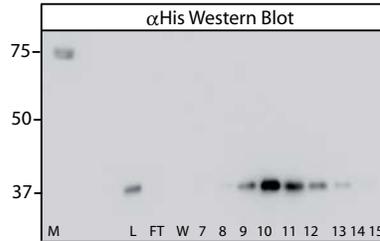


Abbildung 6-34 Nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließender Analyse durch Western Blot: Von den Elutionsfraktionen der AEC und dem Lysat wurden je 0.5 μL und vom Durchfluss und der Waschfraktion je 5 μL unter nicht-reduzierenden Bedingungen per SDS-PAGE analysiert. Der Western Blot wurde mit einem His₆-Antikörper entwickelt. In den Fraktionen 9 bis 13 ist eine deutliche Bande bei ca. 34 kDa zu erkennen, die mtbFGE zugeordnet werden kann. In dieser Analyse wurden keine verschiedenen Konformationen detektiert.

6.2.2 Evaluierung von ΔFGE und mtbFGE für die Synthese aldehydhaltiger Peptide

Bestimmung der spezifischen Aktivität von ΔFGE und mtbFGE

Die spezifische Aktivität von ΔFGE und mtbFGE für die Substratpeptide wurde *in vitro* massenspektrometrisch bestimmt. Die Enzyme katalysieren die Oxidation des Cystein-Restes zu FGly mit einem resultierenden Massenshift von 18.02 Da. Bei der massenspektrometrischen Aktivitätsbestimmung wurde der prozentuale Substratumsatz über die Quantifizierung der Signalintensitäten der monoisotopischen Peaks von Edukt und Produkt bestimmt.^[149] Bei dieser Messung handelt es sich um eine Endpunktbestimmung. Tabelle 6-2 zeigt die spezifischen Aktivitäten in mU/mg für verschiedene Substratpeptide (Abschnitt 6.1.1). Die gemessenen spezifischen Aktivitäten zeigen einen deutlichen Trend. Durch die verkürzte Peptidsequenz von **68** im Vergleich zu **CS1** sinkt die katalytische Aktivität beider Enzyme. Ebenfalls resultiert der Austausch von Thr zu Ala in einer geringeren spezifischen Aktivität. Für **70** konnte massenspektrometrisch kein Umsatz gezeigt werden, da für das aldehydhaltige Peptid **73** kein Signal im MALDI-ToF-MS Spektrum erhalten wurde. Nur durch ESI-MS war eine Ionisierung möglich und die Produktbildung konnte bewiesen werden. Das aldehydhaltige Peptid konnte durch das Signal bei 862.443 $[\text{M}+\text{H}]^+$ identifiziert werden.

Tabelle 6-2 Spezifische Aktivitäten von Δ FGE und mtbFGE: Die Substratpeptide wurden in einem Tris-Puffer bei pH 9.3 in Gegenwart von 2 mM DTT mit FGE oxidiert und der Umsatz wurde massenspektrometrisch bestimmt (n=5). Es wurde Δ FGE aus der aktiveren Fraktion 2 (siehe Abschnitt 6.2.1) nach AEC verwendet. Werte die mit (*) gekennzeichnet sind wurden durch HPLC bestimmt (n=1).

#	Sequenz	Δ FGE mU/mg	mtbFGE mU/mg
CS1	Ac-MTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRS-NH ₂	93.4 ± 3.0	58.1 ± 1.1
68	Ac-YLCTPSRAALLTGR-NH ₂	58.1 ± 1.3	17.6 ± 0.6
69	Ac-YACAPSRGGALTGR-NH ₂	10.0 ± 0.1	4.5 ± 0.1
70	Ac-YLCTPSR-NH ₂	-	3.2*

Weiterhin wurde bei der ESI-MS Analyse von **70** das Disulfid-Dimer detektiert (897.426 [M₂+H₂]²⁺) und LC-ESI-MS Messungen bestätigten die Existenz der 1,1-Diol-Form von FGly. Aufgrund der geringen Massendifferenzen wird eine hohe Auflösung für diese Messungen benötigt. So beträgt z.B. die Differenz zwischen Disulfid-Dimer ([M₂+H₂]²⁺) und 1,1-Diol nur 0.0178 Da. Aufgrund des Auftretens der 1,1-Diol-Form von FGly (vgl. Abschnitt 6.2.6) bei ESI-MS Messungen eignet sich diese Technik nicht für die Bestimmung der spezifischen Aktivität. Die verschiedenen Spezies der FGly-Produkte und die geringen Massendifferenzen erschwerten die exakte Quantifizierung der Signale. Bei der Ionisierung durch MALDI konnte die 1,1-Diol-Form nicht detektiert werden, da durch Trocknung der Proben im Hochvakuum das Gleichgewicht von Aldehyd und Diol zu Gunsten der Aldehydform verschoben wurde. Insgesamt konnte sowohl bei MALDI-ToF-MS als auch bei ESI-MS eine Fragmentierung der Aldehyd-Peptide beobachtet werden, was die massenspektrometrische Bestimmung der spezifischen Aktivität ungenauer macht.

Neben MALDI-ToF-MS könnte die spezifische Aktivität des Enzyms durch RP-HPLC bestimmt werden. Die Extinktionskoeffizienten von Edukt und Produkt sind bei 274 nm identisch. Somit konnte der Umsatz durch Integration der Signale im RP-HPLC-Chromatogramm bestimmt werden. Abbildung 6-35 zeigt Beispiele für die Auswertung der (A) massenspektrometrisch und (B) per RP-HPLC bestimmten Enzymaktivität.

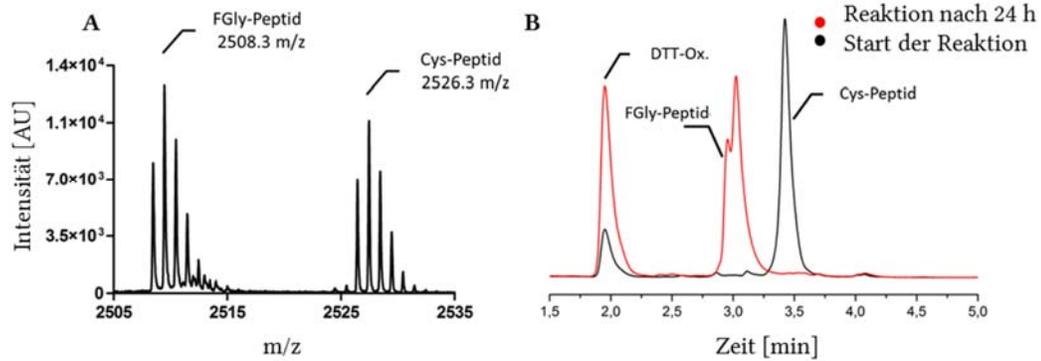


Abbildung 6-35 Bestimmung der Enzymaktivität durch Massenspektrometrie und RP-HPLC: (A) MALDI-ToF-Massenspektrum des **CS1** Peptids. Das Peptid (16 pmol) wurde in Puffer (150 mM Tris, 200 mM NaCl, 45 μ M CaCl₂, pH 9.3) mit BSA (0.33 mg/mL), DTT (2 mM) und FGE (10-20 ng) für 20 Minuten bei 37 °C und 1100 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 % TFA abgestoppt. Die Probe wurde mit Hilfe einer ZipTip C18 aufkonzentriert und 1 μ L der Probe auf eine HCCA-Matrix aufgetragen. Das MALDI-ToF-Massenspektrum wurde am Ultraflex I (Bruker Daltonik) im Reflektor-Positiv-Modus aufgenommen. Das Spektrum zeigt den Massenshift von 18.02 Da zwischen Cys- und FGly-Peptid. (B) RP-HPLC Spektrum bei 274 nm. Der Reaktionsansatz enthielt 500 μ g **70** in einem Gesamtvolumen von 900 μ L. Der Ansatz wurde 24 Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden je 70 μ L abgenommen und in 10 μ L 20% TFA gegeben, um die Reaktion abzustoppen. Die Lösung wurde zentrifugiert und 60 μ L des Überstandes über eine C18-Säule in der RP-HPLC aufgetrennt. Die Elution erfolgte mittels eines linear steigenden Acetonitril-Gradienten. Gezeigt sind die Spektren für die Proben, die nach 0 und 24 Stunden Inkubation genommen wurden. Die Signale für Cys- und FGly- Peptid sind deutlich separiert und eine Integration der Kurven zur Bestimmung der spezifischen Aktivität ist möglich. Auffällig ist die Schulter im Signal für das FGly-Peptid, welche durch die Diol-Form von FGly entsteht. Weiterhin lässt sich bei einer Retentionszeit von 2.0 min oxidiertes DTT detektieren.

Um die Bestimmung der spezifischen Aktivität durch RP-HPLC zu validieren, wurden beide Techniken miteinander verglichen. Für die Validierung wurde das Peptid **68** eingesetzt. Sowohl das Edukt-Peptid **68** mit Cystein als auch das Produkt-Peptid **71** mit FGly lagen in hoher Reinheit >99 % vor. Von beiden Peptiden wurde durch exakte Einwaage eine Stammlösung erstellt. Die Stammlösungen wurden gemischt, um Umsätze von 10 % bis 90 % zu simulieren, anschließend erfolgte die Analyse per MALDI-ToF-MS und RP-HPLC und die gemessenen Umsätze beider Techniken wurden miteinander verglichen. Abbildung 6-36 zeigt die Zusammenfassung dieser Analyse. Die Auftragung gemessener Umsatz, gegen tatsächliche Mischung (Abbildung 6-36 C) verdeutlicht, dass mittels MALDI-ToF-MS geringere Umsätze gemessen wurden, als real in der Probe vorlagen. Die Tabelle 6-3 fasst die Abweichung zwischen Einwaage und Ergebnis der MALDI-ToF-MS-Analyse zusammen. Hier wird deutlich, dass es zu einer Abweichung vom realen Ergebnis von bis zu 31.7 % kommt. Per Einwaage wurde z. B. eine Mischung aus 75 % Aldehyd-Peptid **71** und 25 % Cystein-Peptid **68** hergestellt. Bei der Quantifizierung dieser Probe durch MALDI-ToF-MS wurde ein Anteil von 43.3 % Aldehyd-Peptid gemessen.

Tabelle 6-3 Vergleich von MALDI-ToF-MS und Einwaage:

Umsatz nach Einwaage	MALDI-ToF	Abweichung
10 %	4.4 %	5.6 %
25 %	11.5 %	13.5 %
50 %	20.6 %	29.4 %
75 %	43.3 %	31.7 %
90 %	66.5 %	23.5 %

Die Abweichung könnte daher resultieren, dass es bei der Ionisierung des aldehydhaltigen Peptids **71** zu Fragmentierungen am FGly kommt. Durch diese Nebenreaktion aufgrund der Ionisierungsmethode wird die Abundanz des intakten FGly-Produktes **71** reduziert und es könnten geringere Umsätze gemessen wurden sein. Eine weitere mögliche Ursache wäre, dass beide Peptide **68** und **71** unterschiedlich gut ionisiert werden. Wenn das Cystein-Peptid **68** besser ionisiert als das FGly-Produkt **71** werden ebenfalls geringere Umsätze gemessen. In der klinischen Forschung wird MALDI-ToF-MS für die Detektion von Biomarkern eingesetzt. Albalat *et al.* stellten fest, dass auch in dieser Fragestellung keine exakte Quantifizierung von Peptiden durch eine Standardmessung möglich war.^[238]

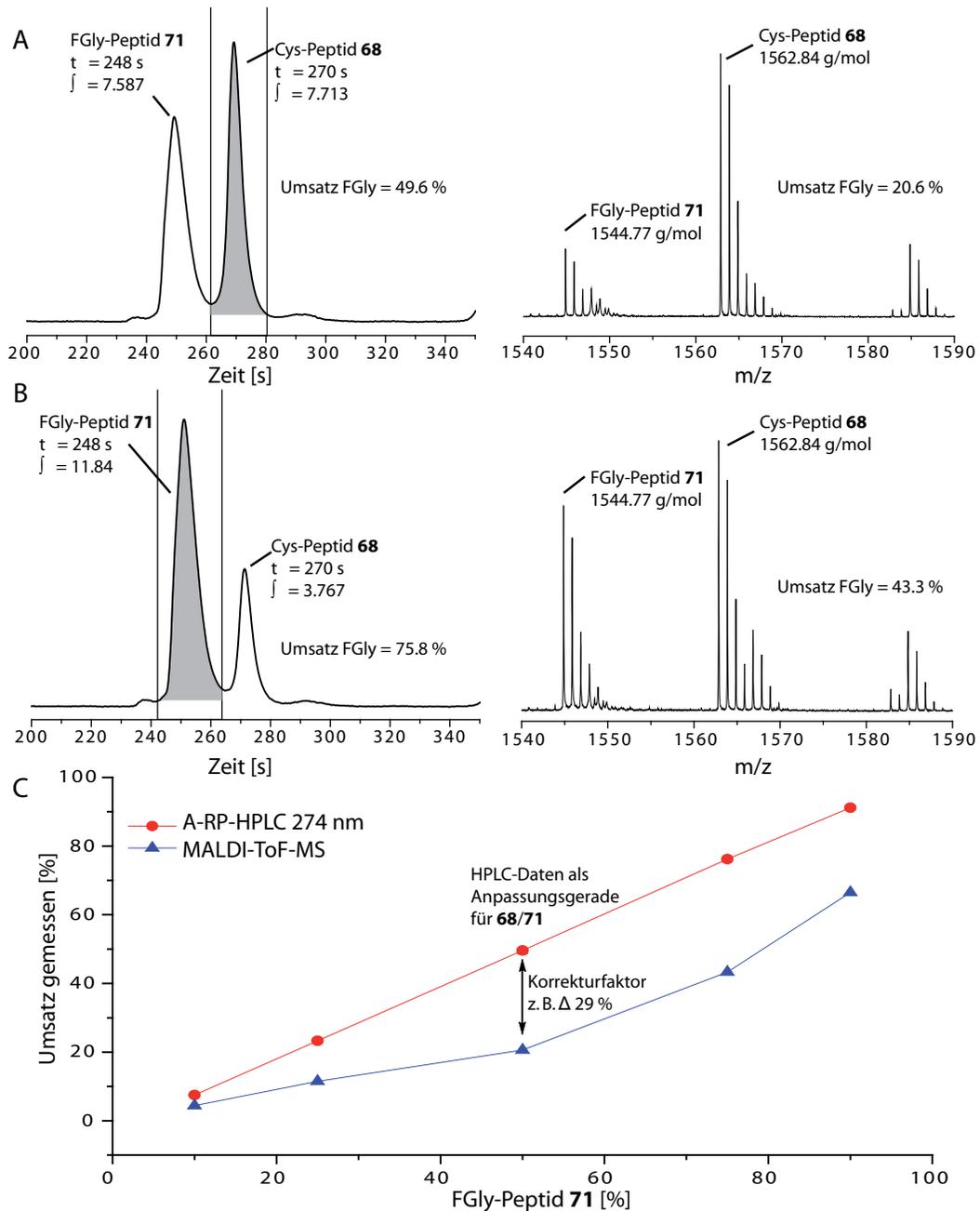


Abbildung 6-36 Vergleich von MALDI-ToF-MS und RP-HPLC: Der Anteil an FGly-Peptid **71** wurde mittels MALDI-ToF und RP-HPLC ($n=1$) gemessen. (A) und (B) zeigen exemplarisch die Spektren aus MALDI-ToF-MS und RP-HPLC Analyse. In (A) wurde durch Mischen der Stammlösungen ein Umsatz von 50 % simuliert und in (B) von 75 %. Die Auftragung des gemessenen Umsatzes, gegen das tatsächliche Verhältnis in (C) zeigt, dass mittels MALDI-ToF-MS geringere Umsätze gemessen wurden als real in der Probe vorlagen, während bei der Analyse mittels RP-HPLC die Werte gut übereinstimmen und einen strikt linearen Verlauf zeigen.

Der Vergleich der Werte von Einwaage und RP-HPLC ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Tabelle 6-4 zeigt, dass es nur bei geringen Umsätzen zu einer höheren Abweichung kommt, dies könnte daran liegen, dass bei der Integration kleiner Signale die Differenzierung zwischen Hintergrund und Signal erschwert ist. Bei allen anderen Umsätzen ist die Abweichung sehr gering. Somit eignet sich die RP-HPLC für die Aktivitätsbestimmung von FGE.

Tabelle 6-4 Abweichungen zwischen RP-HPLC und Einwaage:

Umsatz nach Einwaage	RP-HPLC	Abweichung
10 %	7.5 %	2.5 %
25 %	23.3 %	1.7 %
50 %	49.6 %	0.4 %
75 %	75.8 %	0.8 %
90 %	91.2 %	1.2 %

Der MALDI-ToF-MS-Assay besitzt den Vorteil, dass sehr geringe Mengen an Enzym und Peptidsubstrat eingesetzt werden können. Eine Möglichkeit die Ungenauigkeit dieses Assays zu verringern, könnte ein Korrekturfaktor sein. Durch den RP-HPLC-Assay konnte der Umsatz an FGly-Peptid **71** sehr genau bestimmt werden. Diese Werte könnten für die Korrektur der MALDI-ToF-MS Daten als Anpassungsgerade verwendet werden. Auf dieser Grundlage wurden die in Abbildung 6-36 gezeigten Werte als Korrekturfaktor, zur Berichtigung der spezifischen Aktivitäten von FGE für **68** genutzt. Wird bei der Quantifizierung einer unbekannt Probe ein Anteil von FGly-Peptid **71** von z. B. 20.6 % gemessen kann durch die HPLC-Daten ermittelt werden, dass der reale Umsatz bei 49.6 % liegt. (Tabelle 6-3 und Abbildung 6-36) Wird diese Technik für die in Tabelle 6-2 gezeigten spezifischen Aktivitäten angewendet, konnte die Aktivität von Δ FGE von 58.1 mU/mg auf 75.8 mU/mg korrigiert werden (30.5 % Δ Abweichung) und für mtbFGE von 17.6 mU/mg auf 21.4 mU/mg (21.4 % Δ Abweichung). Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Peptide für jedes Peptid eine eigene Anpassungsgerade erstellt werden muss.

Eine ähnliche Analyse wurde für das Peptid **CS1** durchgeführt. Da das **FGly-CS1**-Peptid jedoch nicht in Reinform vorlag, konnten keine definierten Mischungen erzeugt werden. Daher wurde das **Cys-CS1**-Peptid mit mtbFGE umgesetzt und es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, um den Umsatz zu bestimmen. Diese Proben wurden per RP-HPLC und durch MALDI-ToF-MS untersucht. Abbildung 6-37 zeigt, dass die beiden Detektionsmethoden unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Wie in dem Experiment mit dem Peptid **68** liegt der Umsatz durch MALDI-ToF-MS bestimmt, unter den Werten der RP-HPLC-Analyse. Bei der nach 8 Minuten genommenen Probe liegt die Differenz bei 24.5 % und bei der nach 10 Minuten genommenen Probe bei 25.7 %. Diese Abweichung ist etwas geringer als beim Peptid **68**. Dies könnte daran liegen, dass das **CS1**-Peptid 9 Aminosäuren mehr enthält, als das Peptid **68**, womit der Einfluss einer veränderten Aminosäure prozentual gesehen abnimmt. Werden die in Tabelle 6-2 gezeigten spezifischen Aktivitäten für **CS1** mit der Abweichung korrigiert, kann die spezifische Aktivität von Δ FGE für **CS1** von 93.4 mU/mg auf 116.8 mU/mg korrigiert werden und für mtbFGE von 58.1 mU/mg auf

72.6 mU/mg. Für diese Korrektur dienen die Messpunkte der RP-HPLC als Anpassungsgerade.

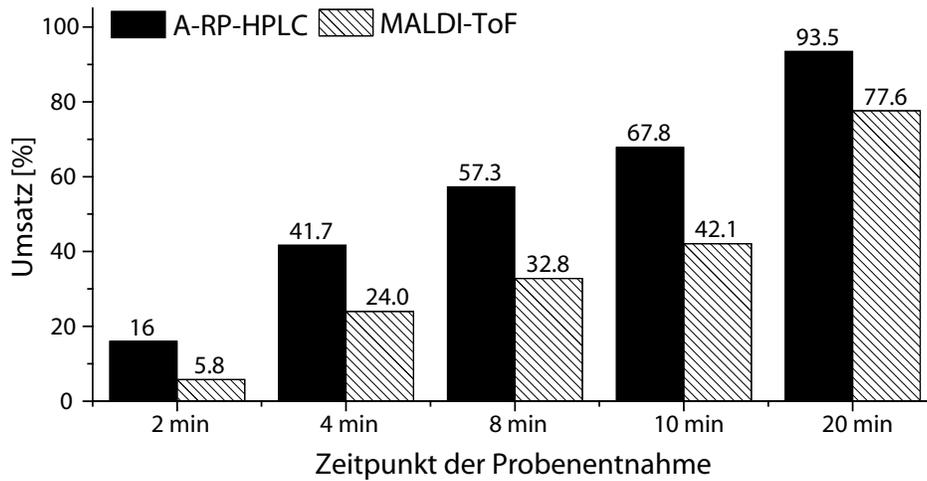


Abbildung 6-37 Umsatzbestimmung mit dem Peptid CS1: Das CS1-Peptid (125 µg, 0.049 µM) wurde mit mtbFGE (20 µg, 0.6 nmol) umgesetzt und im Zeitraum von 20 Minuten wurden verschiedene Proben genommen, welche per MALDI-ToF-MS und RP-HPLC analysiert wurden. Die Konversionsrate zum FGly-CS1 Produkt ist in Prozent angegeben.

Insgesamt konnte die Konversion von Cys zu FGly durch MALDI-ToF-MS bestimmt werden, es kam jedoch bei der Quantifizierung zu ungenauen Ergebnissen, aufgrund der verschiedenen physikalischen Eigenschaften von Edukt- und Produkt-Peptid. Im Vergleich dazu lieferte die Bestimmung des Umsatzes durch RP-HPLC sehr genaue Ergebnisse, da sich der Extinktionskoeffizient bei 274 nm von Edukt und Produkt nicht verändert. Der Nachteil dieser Methode ist, dass deutlich höhere Mengen Enzym und Peptid benötigt werden. Für alle weiteren Quantifizierungen wurde der RP-HPLC-Assay für die Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt. Bei einem qualitativen Vergleich z.B. von verschiedenen Reaktionsbedingungen, wurde der MALDI-ToF-MS-Assay verwendet, da hier geringere Substanzmengen eingesetzt werden können. Unter der Annahme, dass der Fehler des MALDI-ToF-MS-Assays konstant ist, eignet sich diese Technik für den Vergleich verschiedener Bedingungen und Proben. Weiterhin kann der systematische Fehler durch eine Anpassungsgerade berichtigt werden.

6.2.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen von mtbFGE

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität von mtbFGE (Abschnitt 6.2.2) hat gezeigt, dass das Enzym im Vergleich zu anderen Biokatalysatoren eine sehr geringe spezifische Aktivität besitzt. Die maximal gemessene spezifische Aktivität von mtbFGE unter Verwendung des CS1-Peptids als Substrat lag bei 58.1 ± 1.1 mU/mg ($n=3$). Der Mittelwert der spezifischen Aktivität in Tris-Puffer pH 9 aus verschiedenen Experimenten lag bei 8.54 ± 3.19 mU/mg ($n=26$). Im Vergleich dazu werden mit Lipasen oder Esterasen deutlich höhere Aktivitäten erreicht (Triacylglycerolacyl hydrolase EC 3.1.1.3 = 690 U/mg, Carboxylester Hydrolase EC 3.1.1.1 = 100 U/mg)^[239] Somit ist es ein wichtiges Ziel, die spezifische Aktivität des Enzyms durch Optimierung der

Reaktionsbedingungen zu erhöhen. Ansatzpunkte zur Verbesserung der Enzymaktivität können der pH-Wert, die Art und Konzentration des Reduktionsmittels, die Puffersubstanz sowie mögliche Additive sein. Weiterhin wurde analysiert, welches der limitierende Faktor der Biotransformation ist.

Optimierung des pH-Wertes und des Reduktionsmittels

Zuerst wurde der optimale pH-Wert für die Generierung aldehydhaltiger Peptide untersucht. Die Experimente wurden in einem MTGC-Puffer mit dem Peptid **70** durchgeführt. Für die Bestimmung des Umsatzes wurde der RP-HPLC-Assay verwendet und die Ergebnisse der Umsatzbestimmung sind in Abbildung 6-38 A dargestellt.

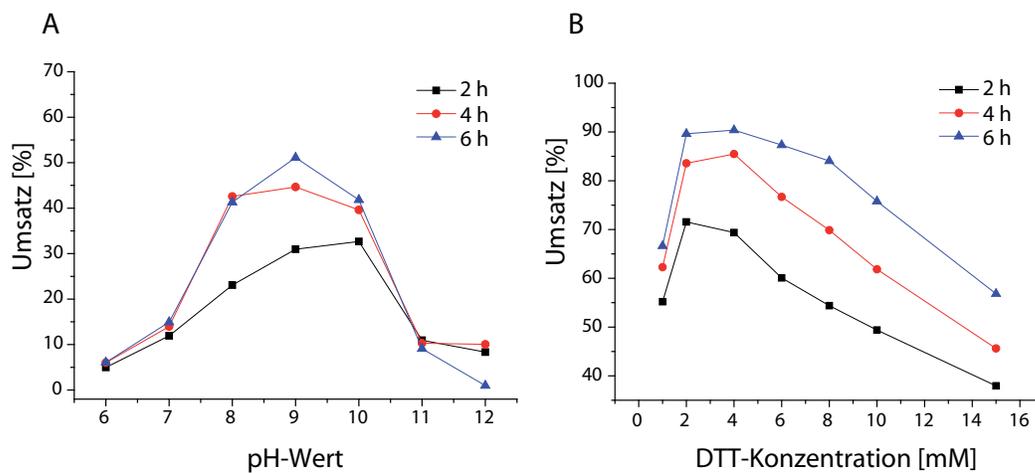


Abbildung 6-38 Optimierung des pH-Wertes und der DTT-Konzentration: (A) Das Substratpeptid **70** (300 µg) wurde mit mtbFGE (100 µg) bei verschiedenen pH-Werten oxidiert. Nach 2 h (Schwarz), 4 h (Rot) und 6 h (Blau) wurden die Proben über RP-HPLC analysiert. Bei einem pH-Wert von 9.3 wurde ein optimaler Umsatz erreicht. (B) Der Substratumsatz wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Reduktionsmittels DTT untersucht. Im Konzentrationsbereich von 2-4 mM DTT wurden die besten Umsätze erzielt.

Unter Berücksichtigung aller durchgeführten Analysen wurde bei einem pH-Wert von 9.-9.5 die höchste Ausbeute an Aldehyd-Peptid erzielt. Somit liegt das pH-Optimum für die Generierung aldehydhaltiger Peptide im alkalischen Bereich. Diese Ergebnisse stimmen mit denen für humanes fFGE und ΔFGE in Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT überein. Das pH-Optimum liegt bei beiden Varianten zwischen 9 und 10.^{[85][223]} Das alkalische pH-Optimum für das im Cytosol vorliegende mtbFGE ist interessant, da das Cytosol von *E. coli* einen pH-Wert von 7.2-7.8 aufweist.^[240] Normalerweise sollte das pH-Optimum eines Enzyms in dem pH-Bereich liegen, der im Kompartiment des Enzyms vorliegt. Diese Diskrepanz zwischen dem pH-Wert im Cytosol von *E. coli* und dem *in vitro* gemessenen pH-Optimum von mtbFGE könnte aus der Verwendung von DTT als Reduktionsmittel resultieren. DTT benötigt für den Thiol-Disulfid Austausch einen leicht alkalischen pH-Wert.^{[241][242]} Abbildung 6-39 zeigt den zweistufigen Reduktionsmechanismus von DTT.

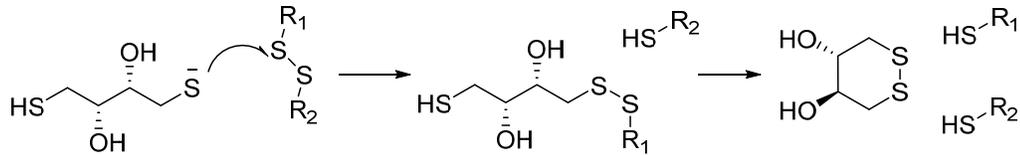


Abbildung 6-39 Thiol-Disulfid Austauschreaktion mit DTT: Nur bei pH-Werten über 7 kann DTT als Reduktionsmittel eingesetzt werden, da das Thiolat benötigt wird. Die pK_s -Werte der Thiolgruppen von DTT liegen bei 9.2 und 10.1 und das Standardredoxpotential bei pH 7 liegt bei -0.33 V.^{[241][242]}

FGE benötigt für die Oxidation von Cystein zu FGly ein Reduktionsmittel (Abschnitt 2.3.3). Aufgrund des pH-Optimums von DTT im schwach alkalischen Milieu könnte das ermittelte pH-Optimum von mtbFGE durch die Eigenschaften des Reduktionsmittels resultieren. Im nächsten Schritt wurde die optimale DTT Konzentration ermittelt. Abbildung 6-38 B verdeutlicht, dass bei einer DTT Konzentration von 2-4 mM DTT die höchste Enzymaktivität vorlag. Höhere Konzentrationen an Reduktionsmittel wirken sich negativ auf die Enzymaktivität aus.

Im Folgenden wurden verschiedene Reduktionsmittel erprobt, um zu evaluieren, ob durch Verwendung anderer Reduktionsmittel höhere spezifische Aktivitäten erzielt werden können. Es wurden das physiologische Reduktionsmittel Gluthathion in reduzierter Form (GSH), Dithiobutylamin (DTBA), β -Mercaptoethanol sowie Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) getestet. Die Experimente wurden mit 2 mM des jeweiligen Reduktionsmittels durchgeführt. Als Substrat wurde **70** verwendet und der Substratumsatz wurde mittels RP-HPLC bestimmt. In Tabelle 6-5 sind die Standardreduktionspotentiale sowie die pK_s -Werte der Thiolgruppen der verwendeten Reduktionsmittel aufgeführt. Das Reduktionsmittel DTBA besitzt ähnliche Eigenschaften wie DTT, jedoch ist eine Reduktion bei niedrigeren pH-Werten möglich, da die pK_s -Werte der Thiol-Gruppen niedriger sind.^[243] TCEP kann ebenfalls als Reduktionsmittel im neutralen und darüber hinaus auch im sauren pH-Bereich eingesetzt werden.^[244]

Tabelle 6-5 Standardreduktionspotentiale und pK_s -Werte der Thiol-Gruppen:

Reduktionsmittel	Standard Reduktionspotential	pK_s der Thiol-Gruppen
β -Mercaptoethanol	-0.20 V ^[245]	9.61 ^[246]
GSH	-0.17 - 0.25 V ^[247]	8.66 ^[248]
DTT	-0.33 V ^{[241][242]}	9.2, 10.1 ^[249]
DTBA	-0.32 V ^[243]	8.2, 9.3 ^[243]
TCEP	-0.29 V ^[244]	-

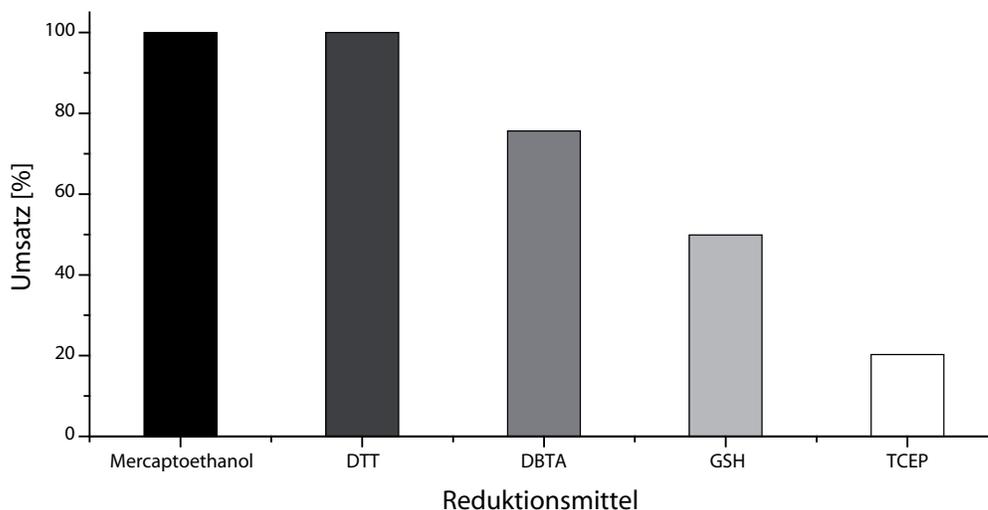


Abbildung 6-40 *In vitro* Konversion von **70** mit verschiedenen Reduktionsmitteln: Es wurden 500 µg Peptid **68** mit mtbFGE (100 µg) in Bicin-Puffer mit 0.2 M Arg und 2 mM des jeweiligen Reduktionsmittels bei 37 °C umgesetzt. Nach 24 h wurden die Proben mittels RP-HPLC analysiert und der Umsatz wurde durch Integration der Edukt- und Produktsignale berechnet.

Die Integration der Edukt- und Produktsignale ergab, dass DTT und β -Mercaptoethanol ähnlich hohe Umsätze erzeugten, die übrigen Reduktionsmittel hingegen erzielen geringere Umsätze. Da bei der Verwendung von β -Mercaptoethanol die Bildung von gemischten Disulfiden zwischen Substratpeptid und Reduktionsmittel beobachtet wurde, wurde für die weiteren Experimente DTT in einer Konzentration von 3 mM als Reduktionsmittel eingesetzt. Experimente mit humanem flFGE haben gezeigt, dass die Enzymaktivität *in vitro* mit DTT höher ist als mit GSH.^[85] Diese Daten konnten für mtbFGE reproduziert werden. Das Standardreduktionspotential von GSH ist im Vergleich zu denen von DTT und β -Mercaptoethanol geringer. (vgl. Tabelle 6-5) Das geringere Reduktionspotential könnte die geringeren Substratumsätze erklären.

Optimierung der Pufferlösung

Ein weiterer Ansatzpunkt, um die Enzymaktivität zu optimieren, ist die Wahl der optimalen Pufferzusammensetzung. Der Zweck eines Puffers liegt darin, den pH-Wert eines Systems stabil zu halten, wobei der pH-Wert, bei dem die Pufferkapazität maximal ist, dem pK_s -Wert des Puffers entspricht. In früheren Arbeiten wurde ein Tris-Puffer für FGE eingesetzt.^{[85][222][223]} Dieser Puffer ist für die Produktion von Aldehyd-Peptiden mittels FGE keine optimale Lösung, da der pK_s -Wert von 2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol (Tris) 8.07 (25 °C) beträgt und somit keine effiziente Pufferung des pH-Wertes bei 9.3 möglich ist. Weiterhin ist der pK_s -Wert von Tris stark temperaturabhängig und nimmt um 0.03 pro 1°C ab.^{[250][251]} Die Puffersubstanzen, die für die von mtbFGE katalysierte Reaktion in Frage kommen und die für die Optimierung ausgewählt wurden, sind Bicin (pK_s 8.26), AMPD (pK_s 8.80) und Taurin (pK_s 9.06). Die Umsätze sowie die spezifischen Aktivitäten wurden durch den MALDI-ToF-MS-Assay mit dem **CS1**-Peptid als Substrat analysiert. Taurin hat von den drei getesteten Puffern denjenigen pK_s -Wert, der am nächsten an dem pH-Wert liegt, bei dem die Reaktion

durchgeführt wird. Dennoch wurden im Vergleich mit Bicin- und AMPD-Puffer geringere Umsätze ($32.62 \pm 4.75 \%$) erzielt und die spezifische Aktivität von mtbFGE in einem Taurin-Puffer liegt bei $13.05 \pm 1.90 \text{ mU/mg}$ ($n=5$). Sowohl mit dem Bicin-Puffer als auch mit dem AMPD-Puffer konnte eine deutliche Steigerung der Umsätze erreicht werden. Für den AMPD-Puffer wurden ein Umsatz von $72.23 \pm 8.6 \%$ und eine spezifische Aktivität von $28.89 \pm 2.51 \text{ mU/mg}$ ($n=3$) gemessen. Der Umsatz unter Einsatz des Bicin-Puffers lag bei 100% ($n=9$). Zusätzlich dazu zeigt der Bicin-Puffer eine sehr gute Stabilität des pH-Wertes bei verschiedenen Temperaturen ($\Delta\text{pH}/T = 0.0149$, Messung nicht abgebildet). Für die nachfolgenden Experimente wurde daher ein Bicin-Puffer eingesetzt.

Durch die Langzeitlagerung oder bei Biotransformationen nimmt die Aktivität des Enzyms deutlich ab. Dies kann verschiedene Ursachen haben, zu denen insbesondere die Denaturierung, Aggregation sowie intra- und intermolekulare chemische Modifizierung gehören.^[252] Besonders bei Proteinen mit vielen Cystein-Resten stellt die Aggregation ein großes Problem dar.^[253] Der Zusatz von Additiven wie Polymeren, Aminen und Aminosäuren zu den verwendeten Reaktionspuffern ist ein einfacher Ansatz diese Problematik abzumildern. Daher wurden Arginin, Imidazol, PEG 1000, Harnstoff sowie Kombinationen dieser Zusätze für die Produktion aldehydhaltiger Peptide mittels mtbFGE getestet.^{[252][254][255]}

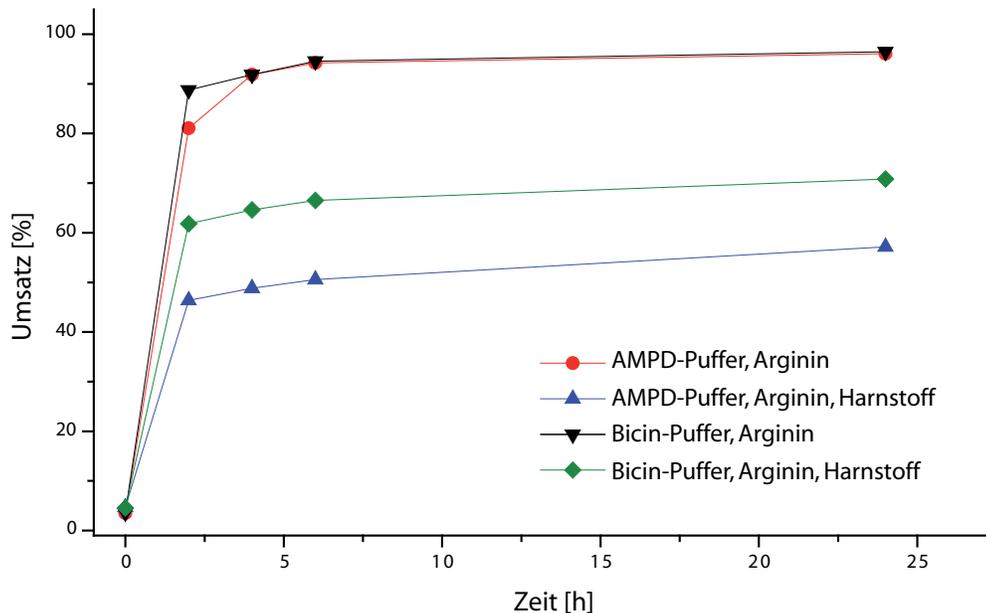


Abbildung 6-41 *In vitro* Umsatz mit mtbFGE unter verschiedenen Puffer-Bedingungen: Dargestellt ist der Umsatz in % von 500 μg Peptid **70** mit 100 μg mtbFGE. Nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h bei 37 °C wurden Proben per RP-HPLC analysiert. Die Experimente wurden in 50 mM AMPD- oder Bicin-Puffer mit 0.2 M Arginin bzw. 0.2 M Arg und 0.2 M Harnstoff durchgeführt.

Mit Hilfe des MALDI-ToF-MS-Assays wurde der Umsatz des **CS1**-Peptids durch mtbFGE in Gegenwart dieser Additive bestimmt. Arginin, Imidazol und Harnstoff zeigten einen positiven Effekt auf die katalytische Aktivität von mtbFGE. Durch den

RP-HPLC-Assay wurde im Anschluss der Umsatz von **70** mit verschiedenen Additiven über einen längeren Zeitraum verfolgt. Abbildung 6-41 zeigt eine Auswahl an verschiedenen Bedingungen. Obwohl sowohl Harnstoff als auch Arginin einen positiven Effekt auf den Umsatz zeigten, erwies sich die Kombination aus beiden Additiven als nicht geeignet. Unter Berücksichtigung aller durchgeführten Analysen konnten die besten Ergebnisse bei Verwendung eines Bicin-Puffers bei pH 9.3 mit 0.2 M Arginin als Additiv erzielt werden.

Weitergehend wurde zudem evaluiert, welchen Einfluss die Temperatur auf den Substratumsatz hat. Höhere Temperaturen könnten zu höheren spezifischen Aktivitäten führen, allerdings wäre es ebenso denkbar, dass bei niedrigeren Temperaturen eine höhere Enzymstabilität erzielt wird. Der Umsatz bei verschiedenen Temperaturen ist in Abbildung 6-42 dargestellt.

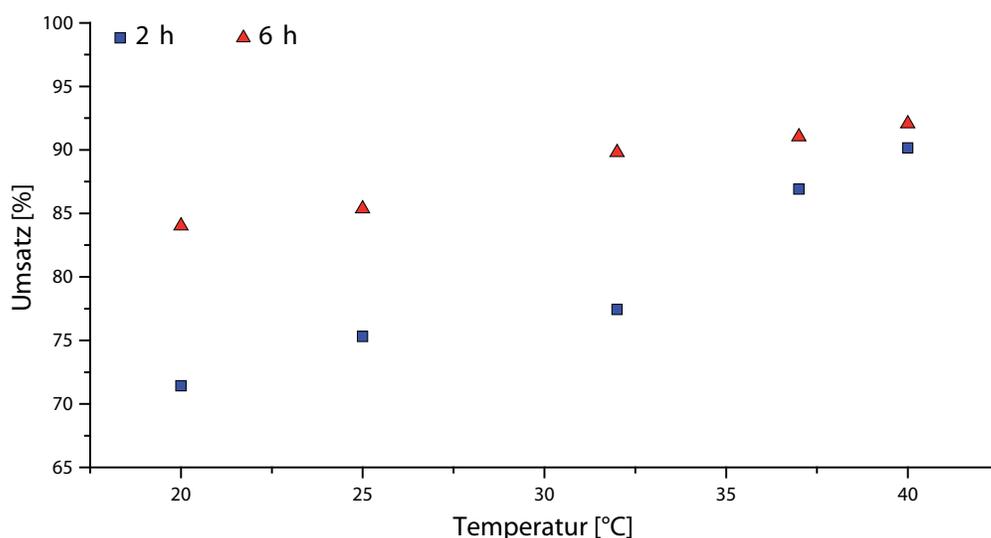


Abbildung 6-42 Umsatz von **70** bei verschiedenen Temperaturen: Dargestellt ist der Umsatz in % von 500 µg Peptid P3 nach 2 h und 6 h. Es wurden jeweils 100 µg mtbFGE in Bicin-Puffer mit 0.2 M Arg bei Temperaturen von 20°C, 25°C, 32°C, 37°C und 40°C eingesetzt.

Generell nahm mit steigender Temperatur der Umsatz geringfügig zu. Beispielsweise lag nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 20°C der Umsatz bei 71.4 %. Im Vergleich dazu wurde bei 40°C ein Umsatz von 90.1 % erzielt. In allen Ansätzen kam es zu einer Präzipitation von mtbFGE. Damit ist die Enzymstabilität bei niedrigeren Temperaturen nicht signifikant besser als bei höheren Temperaturen. Aufgrund der höheren Umsätze bei höheren Temperaturen wurden für die folgenden Experimente Temperaturen zwischen 37 °C und 40 °C gewählt.

Untersuchung möglicher limitierender Faktoren

Peng *et al.* konnten zeigen, dass die Oxidation von Cystein zu FGly durch humanes FGE stöchiometrische Mengen an molekularem Sauerstoff benötigt. Bei einer O₂ Konzentration von 9 % wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten gemessen, bei einer O₂-Konzentration unter 1% hingegen konnte keine Enzymaktivität detektiert werden.^[82] Um zu evaluieren, ob Sauerstoff ein limitierender Faktor bei der

präparativen Produktion aldehydhaltiger Peptide ist, wurde **70** im verschlossenen Reaktionsgefäß und unter Begasung mit 6 % O₂ durch mtbFGE oxidiert. Beide Experimente zeigen identische Umsätze.

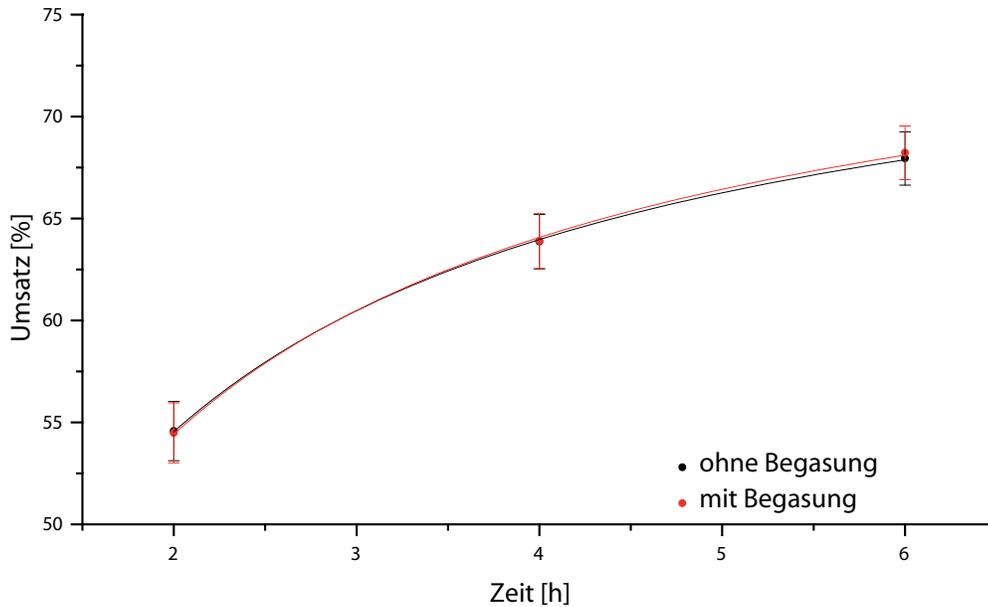


Abbildung 6-43 Umsatz durch mtbFGE *in vitro* mit und ohne Begasung von O₂: Dargestellt ist der Umsatz in % von 500 µg Peptid **70** durch 50 µg mtbFGE nach 2 h, 4 h und 6 h mit Begasung bei 6 % Sauerstoffgehalt (Rot) und im verschlossenen Reaktionsgefäß (Schwarz) (n=3).

Für dieses Experiment wurde ein Volumen von 900 µL Puffer in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß eingesetzt um 0.565 µmol Peptid **70** umzusetzen. In der Reaktionslösung sind ca. 0.511 µmol O₂ in Lösung,^[256] weiterhin sind laut idealem Gasgesetz ≈ 4.95 mmol O₂ im Reaktionsgefäß vorhanden. Somit ist auch bei einem geschlossenen Reaktionsgefäß ausreichend Sauerstoff für die Oxidation von Cystein zu FGly vorhanden und stellt keinen limitierenden Faktor dar.

Zusammenfassend ist der Bicin-Puffer am besten für die Produktion von aldehydhaltigen Peptiden geeignet. Weiterhin konnte durch die Zugabe von 0.2 M Arginin die spezifische Aktivität von mtbFGE deutlich gesteigert werden. Das bislang beste erprobte Reduktionsmittel für die Oxidation von Cystein zu FGly ist DTT in einer Konzentration von 3 mM. Trotz der geringen Halbwertszeit von DTT in Lösung (0.6 h bei 40 °C, pH 8.5)^[257] stellt DTT keinen limitierenden Faktor dar, da durch kontinuierliche Zugabe von DTT keine höheren Umsätze erzielt wurden (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls ist die Menge an Sauerstoff im Reaktionsgefäß ausreichend und es konnten keine erhöhten Umsätze durch zusätzliche Sauerstoffzufuhr erzielt werden. Abbildung 6-44 zeigt den Reaktionsverlauf der Produktion von Aldehydpeptiden mit mtbFGE unter den optimierten Bedingungen (50 mM Bicin, 0.2 mM Arginin, 3 mM DTT, 37 °C). Im Zeitraum bis 60 Minuten ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzym-Substrat-Reaktion im linearen Bereich. Der 30 Minuten-Wert wurde verwendet um die

spezifische Aktivität zu berechnen, diese liegt bei $63.56 \pm 1,68$ mU/mg ($n=3$). Im Vergleich dazu wurden zu Beginn dieser Arbeit unter Verwendung von Tris-Puffer pH 9 Aktivitäten von ca. 3.2 mU/mg für **70** erzielt. Für das längere Substratpeptid **CS1**, welches besser umgesetzt wird lag die spezifische Aktivität in Tris-Puffer pH 9 bei 8.54 ± 3.19 mU/mg ($n=26$). Somit konnte durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen die Enzymaktivität erheblich gesteigert werden.

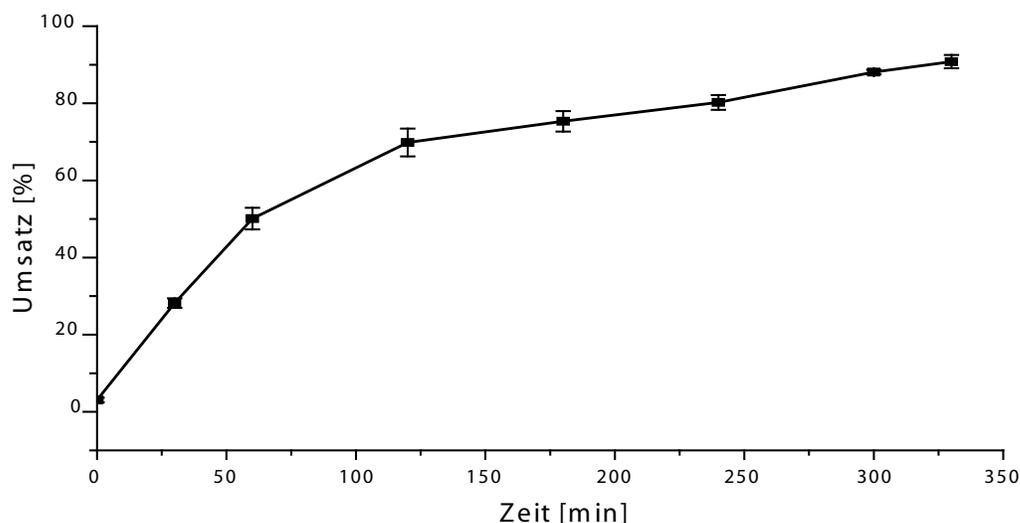


Abbildung 6-44 Umsatz von **70** unter optimierten Bedingungen (50 mM Bicin, 0.2 mM Arginin, 3 mM DTT, 37 °C): Dargestellt ist der Umsatz in % von 500 µg Peptid **68** durch 100 µg mtbFGE ($n=3$). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und per RP-HPLC analysiert.

Einfluss von Kupfer-Ionen auf die katalytische Aktivität

Später wurde von Holder *et al.* und Knop *et al.* eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivität von FGE in Anwesenheit von Kupfer-Ionen publiziert.^{[22][17][20]} Um zu überprüfen, ob auch die Aktivität von mtbFGE durch Kupfer-Ionen gesteigert werden kann, wurde in Zusammenarbeit mit T. Beuel eine Kupferrekonstitution von mtbFGE durchgeführt. Der Anteil an Kupfer-Ionen im Verhältnis zum Enzym wurde mittels *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS) bestimmt.^[258] Das Verhältnis von Enzym zu Kupfer-Ionen wurde nach der Reinigung mittels IMAC-Affinitätschromatographie untersucht. Zusätzlich wurden die Kupfer-Ionen im Puffer durch einen Chelator abgereichert. Die zweite Messung wurde nach der Kupferrekonstitution durchgeführt. Tabelle 6-6 zeigt, dass durch die Kupferrekonstitution ein deutlich höheres Verhältnis aus gebundenem Kupfer-Ionen und Enzym erreicht wurde. Von beiden Präparationen wurde zudem die spezifische Aktivität in Tris-Puffer pH 9 mithilfe des MALDI-ToF-MS-Assay bestimmt. Hierfür wurden im Falle der Probe ohne Kupfer alle Puffer und Lösungen mit einem Chelator behandelt um Kupfer-Ionen zu komplexieren. Nach Abreicherung der Kupfer-Ionen lag die spezifische Aktivität von mtbFGE bei 2.6 ± 0.02 mU/mg ($n=3$). Nach der Rekonstitution mit Kupfer konnte eine spezifische Aktivität von 18.4 ± 0.06 mU/mg

(n=3) gemessen werden. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass Kupfer-Ionen für die katalytische Aktivität von mtbFGE wichtig sind.

Tabelle 6-6 Verhältnis von mtbFGE zu gebundenen Kupfer-Ionen nach IMAC und Rekonstitution:

Probe	Verhältnis mtbFGE zu Kupfer
mtbFGE ohne Kupfer	0.04
mtbFGE nach Rekonstitution	0.2

Die in Abschnitt 6.2.3 optimierten Reaktionsbedingungen für mtbFGE wurden dahingehend modifiziert, dass dem Bicin-Puffer 50 μM CuSO_4 zugesetzt wurden. Abbildung 6-45 zeigt den Vergleich zwischen der Enzymreaktion. In dem Ansatz ohne CuSO_4 wurde eine spezifische Aktivität von 71.62 ± 0.24 mU/mg (n=3) gemessen und der Umsatz lag bei 37.83 ± 0.33 %. Der Ansatz mit CuSO_4 zeigt bereits nach 30 Minuten einen nahezu vollständigen Umsatz (n=3). Somit muss die spezifische Aktivität mit 50 μM CuSO_4 über 190 mU/mg liegen.

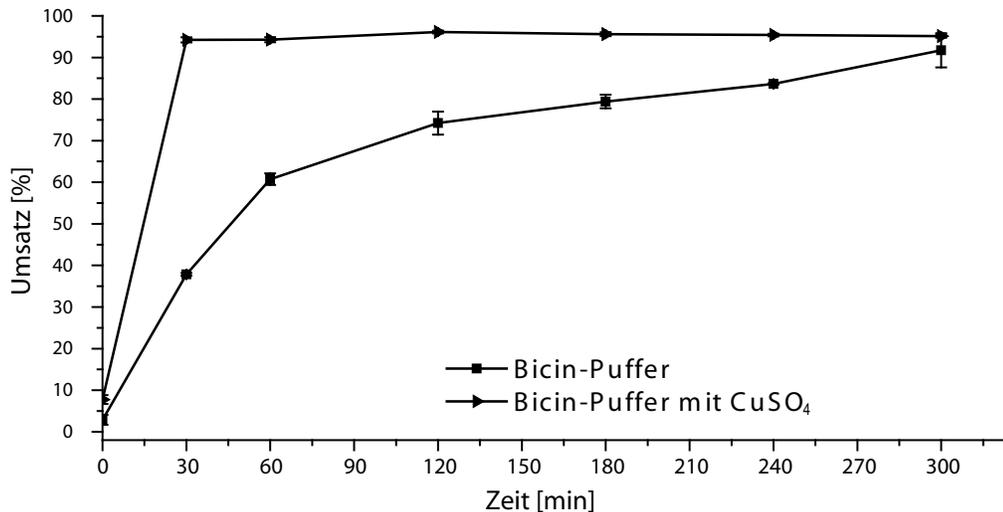


Abbildung 6-45 Umsatz von Peptid 70 mit und ohne Zusatz von 50 μM CuSO_4 : Dargestellt ist der Umsatz in % von 500 μg Peptid 70 durch 100 μg mtbFGE (n=3). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und per RP-HPLC analysiert.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Kupfer-Ionen die katalytische Aktivität von mtbFGE deutlich steigern. Die genaue Rolle von Kupfer für das Enzym ist Gegenstand aktueller Forschung. Für die Produktion von Aldehyd-Peptiden ist die Zugabe von CuSO_4 wichtig um eine höhere Effizienz zu erreichen.

6.2.4 *M. tuberculosis* FGE in der Peptidsynthese

Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen von mtbFGE im analytischen Maßstab wurde das Enzym für die präparative Generierung von FGly in Peptiden

eingesetzt. In der konventionellen Lösungssynthese bzw. Festphasensynthese ist es nur unter hohem Schutzgruppenaufwand möglich, FGly in einer Peptidsequenz darzustellen.^[259]

Das Substratpeptid wurde, wie in Abschnitt 6.2.2 beschrieben, mittels Festphasenpeptidsynthese am Rink-Amid-Harz hergestellt. Nach der Synthese wurden die Schutzgruppen mittels TFA abgespalten. Im Anschluss der Reinigung des Peptids **70** durch präparative RP-HPLC konnte das Cystein-Peptid **70** für die Oxidation durch mtbFGE verwendet werden. Für die Reaktion wurde ein 100 mL Bioreaktor mit Clark Elektrode und pH-Sonde eingesetzt. In diesem Aufbau wurden 63 mg **70** mit mtbFGE umgesetzt. Jede Stunde wurde eine Probe entnommen und per RP-HPLC analysiert um den Verlauf der Reaktion zu verfolgen. Die Integration der Chromatogramme bei 274 nm von Cystein- **70** und FGly-Peptid **73** wurde zur Berechnung des Umsatzes verwendet. Über die Integration des Signals von oxidiertem DTT kann bestimmt werden, ob reduziertes DTT im Reaktionsansatz in ausreichender Menge vorhanden war. Abbildung 6-46 zeigt die Zusammenfassung dieses Experimentes. Die Berechnung des Umsatzes zeigt, dass die Reaktion nach 2 Stunden stoppt, daher wurde die Reaktion nach 4 Stunden aufgearbeitet. Der Umsatz lag bei 87 % und nach Reinigung des Peptides **73** mittels RP-HPLC konnte eine Ausbeute von 51 mg FGly-Peptid erzielt werden, was 82 % entspricht. Um abzuschätzen wie viele Moleküle Aldehyd-Peptid pro Enzym umgesetzt wurden, wurde die katalytische Produktivität (*turnover number*, TON) berechnet, diese lag bei 87. Um die Ursache für den unvollständigen Umsatz des Peptides **70** zu ermitteln, wurden die Daten der Sonden ausgewertet. Der pH-Wert blieb im Laufe der Enzymreaktion stabil zwischen pH 9.3 und pH 9.0. Lediglich nach Zugabe von DTT zu Beginn der Reaktion ist eine leichte Abnahme des pH-Wertes zu erkennen. Der Sauerstoffpartialdruck sinkt nach dem Start der Reaktion deutlich ab, jedoch reicht der Sauerstoffeintrag in die Lösung nach Erhöhung der Rührgeschwindigkeit aus, um den Bedarf zu decken. Im Zeitraum von 30 bis 90 Minuten nach Reaktionsstart ist der Sauerstoffpartialdruck konstant und es liegt ein Gleichgewicht aus Eintrag und Verbrauch vor. Die Experimente, die in Abschnitt 6.2.3 diskutiert wurden, verdeutlichen, dass der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck nicht für das Erliegen der Enzymreaktion nach 2 Stunden verantwortlich sein können. Durch RP-HPLC kann der Anstieg der Konzentration an oxidiertem DTT verfolgt werden. Da reduziertes DTT kein Signal im RP-HPLC Chromatogramm erzeugt, kann die exakte Konzentration an reduziertem DTT in Lösung nicht bestimmt werden. Solange jedoch der Anteil an oxidiertem DTT linear zunimmt, kann geschlossen werden, dass die Konzentration an reduziertem DTT für die Enzymreaktion ausreichend ist. Abbildung 6-46 zeigt, dass zwischen 2 und 4 Stunden eine lineare Zunahme an oxidiertem DTT vorliegt, daher kann das Reduktionsmittel nicht der limitierende Faktor sein. Eine eindeutige Erklärung liefert Abbildung 6-46 B, wo deutlich zu erkennen ist, dass mtbFGE im Verlauf der Reaktion präzipitiert.

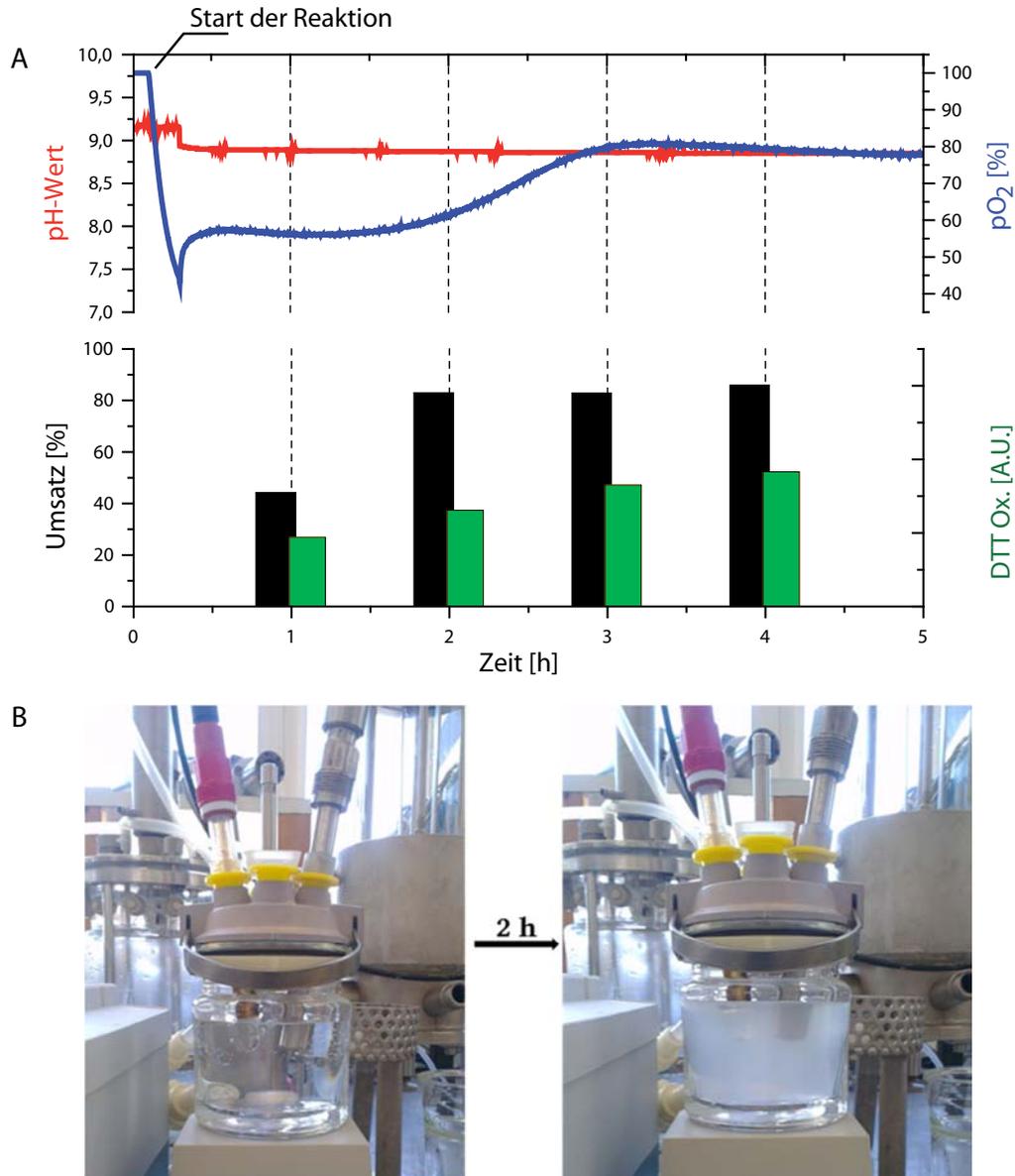


Abbildung 6-46 Umsatz von **70** durch mtbFGE im präparativen Maßstab: Es wurde **70** (63 mg, 71.2 μmol) mit mtbFGE (25 mg, 0.72 μmol) umgesetzt. Für diese Reaktion wurde ein Bicin-Puffer pH 9.3 mit 0.2 M Arg, 3 mM DTT in einem Volumen von 113 mL verwendet. (A) zeigt den pH-Wert der Lösung (Rot) im Verlauf der Reaktion. In Blau ist der Sauerstoffpartialdruck gezeigt, der durch die Clark-Elektrode gemessen wurde. Die schwarzen Balken zeigen den Umsatz von Cystein-**70** zu FGly-Peptid **73** der durch RP-HPLC ermittelt wurde. Weiterhin wurde durch die RP-HPLC die Zunahme an oxidiertem DTT in Lösung (Grün) bestimmt. In (B) ist der Aufbau des Experimentes dargestellt. Nach 2 h Reaktionszeit ist die Präzipitation von mtbFGE deutlich zu erkennen.

Somit stellt die Enzymstabilität den Kapazitätenengpass für die Produktion von Aldehyd-Peptiden dar. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist die Konzentration an Kupfer-Ionen für die katalytische Aktivität von mtbFGE entscheidend. Das hier

diskutierte Experiment wurde vor den Publikationen von Holder *et al.* und Knop *et al.* durchgeführt.^{[22][17]} Daher wurde dem Puffer noch kein CuSO₄ zugesetzt. Diese Modifikation der Reaktionsbedingungen könnte bei weiteren präparativen Biokonversionen von Cystein-Peptiden durch mtbFGE zu einer höheren TON führen.

6.2.5 Immobilisierung von *M. tuberculosis* FGE

Der Umsatz in präparativen Ansätzen hat gezeigt, dass mtbFGE lediglich eine geringe Enzymstabilität aufweist. Während einer 1-wöchigen Lagerung des Enzyms in Bicin-Puffer pH 8 mit 0.2 mM Arginin bei 4°C konnte keine signifikante Abnahme der Enzymaktivität beobachtet werden. Jedoch kommt es während der Biotransformation von Cys- zu FGly-Peptiden nach ungefähr zwei Stunden zur Präzipitation von mtbFGE. Dies stellt den Kapazitätenengpass der Reaktion mit mtbFGE dar. Um die Stabilität von mtbFGE für den Umsatz von Peptiden *in vitro* zu verbessern wurden, Techniken für die Enzymimmobilisierung erprobt. Vorteile der Immobilisierung sind die höhere Wiederverwertbarkeit des Enzyms, die leichtere Abtrennbarkeit vom Reaktionsgemisch und in vielen Fällen die Stabilisierung des Enzyms.^[260] Die Immobilisierung von Enzymen kann durch kovalente, physikalische oder ionische Bindung des Enzyms an eine feste Phase erfolgen. Ebenso ist der Einschluss des Enzyms in anorganischen oder organischen Polymeren möglich.^[215] Eine dritte Strategie ist die Quervernetzung von Enzymaggregaten mittels bifunktionaler Moleküle wie Glutaraldehyd. Die *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) wurden erfolgreich für die Ko-Immobilisierung von Halogenasen mit einer Flavin-Reduktase und Alkoholdehydrogenase eingesetzt. Dabei wurde das *E. coli* Lysat mit der überexprimierten Halogenase mit den benötigten Hilfsenzymen versetzt, mittels Ammoniumsulfat gefällt und mit Glutaraldehyd quervernetzt.^{[261][262]}

Immobilisierung von mtbFGE durch CLEAs

Das Protokoll von Frese *et al.* wurde für die Immobilisierung von mtbFGE erprobt.^[261] Das *E. coli* Lysat wurde nach der Überexpression von mtbFGE mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend bei einer Glutaraldehyd-Konzentration von 0.5 % (v/v) quervernetzt. Jedoch kam es bei der anschließenden Biotransformation von **69** zu sehr vielen Nebenprodukten, da andere Enzyme des Lysats, wie Proteasen ebenfalls in aktiver Form immobilisiert werden. Selbst mit hohen Konzentrationen eines Proteinase-Inhibitors konnte dieses Problem nicht gelöst werden. Daher wurde in einem weiteren Versuch gereinigtes mtbFGE mit BSA (1:19 w/w) als Füllmaterial versetzt, durch Ammoniumsulfat gefällt und mit Glutaraldehyd quervernetzt. Mit Hilfe der so erzeugten CLEAs konnte die Oxidation von Cystein zu FGly erfolgreich durchgeführt werden. Die Umsätze der Biotransformation wurden per RP-HPLC bestimmt. (vgl. Abbildung 6-47) Bei den in Abschnitt 6.2.3 beschriebenen Bedingungen konnten nach 2 h Reaktionsdauer, unter Verwendung von 100 µg mtbFGE, Umsätze von über 70 %, erzielt werden. Im Vergleich dazu wurden bei der CLEA-Immobilisierung mit der doppelten Enzymmenge geringere Umsätze von maximal 41 % erreicht.

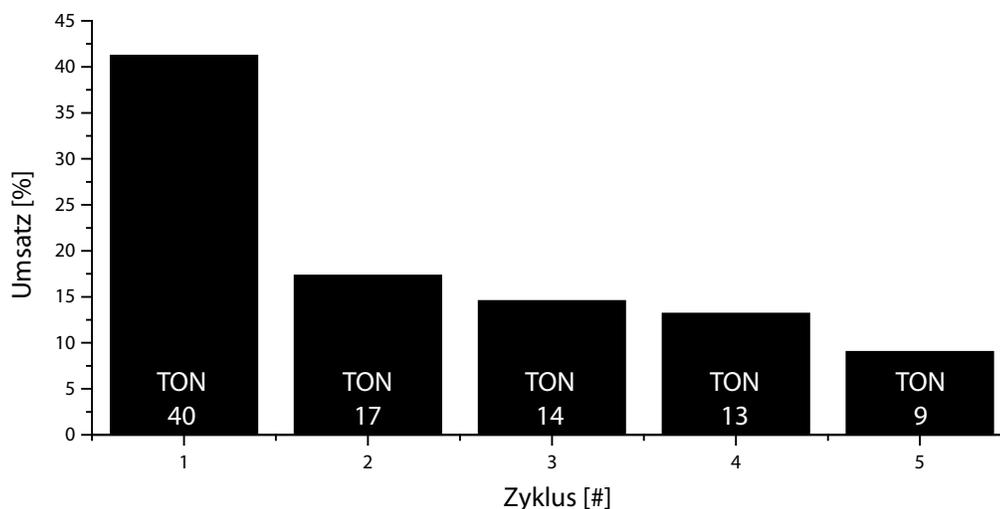


Abbildung 6-47 Oxidation von **69** durch mtbFGE-CLEAs: Es wurden 200 µg mtbFGE mit der CLEA-Technik immobilisiert und anschließend für die Produktion des Aldehyd-Peptids **72** evaluiert. Es wurden fünf Zyklen, an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug jeweils 2 h. Das Balkendiagramm zeigt den Umsatz der Zyklen sowie die berechnete TON der Zyklen.

Eine Möglichkeit die Enzymstabilität abzuschätzen ist die Berechnung der katalytischen Produktivität (TON). Im analytischen Maßstab wurde für das frei in Lösung befindliche Enzym, nach 2 h Reaktionsdauer eine TON von 142 erreicht. Unter der Annahme, dass die Immobilisierung von mtbFGE quantitativ verlief, kann für die CLEAs eine TON von 40 berechnet werden. Weiterhin konnten die CLEAs für mehrere Zyklen eingesetzt werden, wodurch insgesamt eine TON von 93 erzielt wurde. Somit ist die Immobilisierung von mtbFGE mit dieser Technik möglich, jedoch ist die Aktivität und Effizienz des Immobilisats geringer als mit Enzym in Lösung. Einer der wichtigsten Vorteile der Immobilisierung durch CLEAs ist die Kombination einer partiellen Anreicherung des gewünschten Enzyms durch die Ammoniumsulfatfällung mit der anschließenden Immobilisierung, sodass auch Lysate eingesetzt werden können.^[261] Da die Substrat-Peptide von mtbFGE eine Vielzahl verschiedener funktioneller Gruppen tragen, die potentielle Substrate von anderen *E. coli* Enzymen sind, kann die Immobilisierung von mtbFGE aus dem Lysat nicht praktikabel durchgeführt werden.

Immobilisierung von mtbFGE durch ein Epoxid-Harz

Als alternative Technik wurde die kovalente Verknüpfung zwischen einer festen Phase und dem gereinigtem Enzym evaluiert. Als feste Phase wurde ein Harz (EP 403/s-RESINDION) erprobt, welches Epoxide für die Immobilisierung von Enzymen enthält. Die Methylengruppen des Epoxids sind aufgrund der Ringspannung reaktive Elektrophile und können mit Nucleophilen, wie beispielsweise Lysin- oder Cystein-Seitenketten, unter Ringöffnung reagieren. Durch die Software I-Tasser wurde die *solvent accessibility* (SA) der drei in mtbFGE enthaltenden Lysin-Reste berechnet,^{[78][79]} welche auf einer Skala von 0 (geringe Exposition) bis 10 (hohe Exposition) in *arbitrary units* (AU) angibt wie gut ein Bereich für Lösungsmittel und andere Moleküle zugänglich ist. Für Lysin¹⁷⁰ und Lysin²⁴² wurde eine SA von 4 berechnet und für Lysin²⁵⁷ ein Wert von 1. Insgesamt

zeigen die Lysin-Reste keine hohe Exposition zum Lösungsmittel. Ein weiterer möglicher Reaktionspartner für das Epoxid-Harz sind bei leicht alkalischen pH-Wert die acht Cystein-Reste. Für die redox-aktiven Cystein-Reste Cystein²⁶³ und Cystein²⁶⁸ im aktiven Zentrum wurde eine SA von 0 berechnet, somit sind Nebenreaktionen mit den am Katalysezyklus beteiligten Aminosäuren sehr unwahrscheinlich. Nach der Immobilisierung von mtbFGE wurde die Aktivität des Immobilisats für **69** bestimmt. Abbildung 6-48 zeigt den Umsatz der Biotransformation und die berechnete TON der Zyklen.

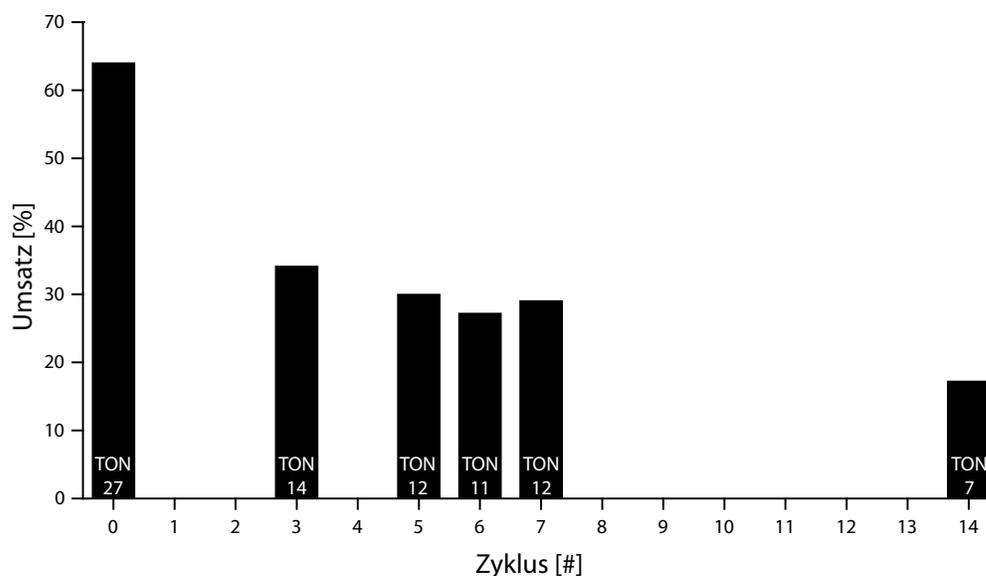


Abbildung 6-48 Umsatz von **69** nach Immobilisierung von mtbFGE an einem Epoxid-Harz: Die Immobilisierung erfolgte mit 4 mg mtbFGE, wovon 1.7 mg gebunden werden konnten (Quantifizierung aus SDS-PAGE). Es wurden sechs Zyklen in einem Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug jeweils 2 h. Das Balkendiagramm zeigt den Umsatz der Zyklen sowie die berechnete TON der Zyklen. Es wurden jeweils 3 mg **69** für den Umsatz verwendet.

Durch das Epoxid-Harz konnte nur ein geringer Anteil von 42.5 % des eingesetzten mtbFGEs immobilisiert werden. Eine mögliche Ursache ist die zu geringe Exposition geeigneter Nukleophile an der Oberfläche des Enzyms für die kovalente Verknüpfung mit dem Epoxid. Neben den geringen Ausbeuten bei der Immobilisierung wurde weiterhin ein geringerer Umsatz erzielt als mit Enzym in Lösung. Für **69** wurde in Lösung eine TON von 223 gemessen. Im Vergleich dazu liegt die TON über sechs Zyklen für das Immobilisat bei 83. Insgesamt ist die kovalente Immobilisierung von mtbFGE an einem Epoxid-Harz nicht geeignet für die präparative Produktion von Aldehyd-Peptiden. Der Vergleich der Zyklen drei bis sieben zeigt, dass es in diesem Zeitraum zu keiner deutlichen Abnahme der Umsätze kommt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass durch die Immobilisierung von mtbFGE eine Stabilisierung des Enzyms erzielt werden kann. Jedoch wird eine andere Strategie benötigt, um gute Ausbeuten bei der kovalenten Bindung zwischen Enzym und Trägermaterial zu erreichen.

Immobilisierung von *M. tuberculosis* FGE durch den Aldehyd-tag

Die Ergebnisse der vorherigen Abschnitte haben gezeigt, dass durch kovalente Verknüpfungen mit Glutaraldehyd oder einem Trägermaterial mit den Aminosäureseitenketten des Enzyms keine höheren Umsätze durch Immobilisierung erzielt werden können. Um die Zugänglichkeit einzelner AS in mtbFGE zum Lösungsmittel oder anderen Molekülen abschätzen zu können, wurde die *solvent accessibility* durch die Software I-Tasser berechnet. Diese Untersuchung zeigte, dass insbesondere die drei Lysin-Reste im Enzym gering exponiert sind. Da diese funktionellen Gruppen für die Immobilisierung durch CLEAs oder Epoxid-Harze wichtig sind, konnte durch bisherige Experimente keine effektive Immobilisierung von mtbFGE erzielt werden.

Wang *et al.* zeigten, dass die ortsgerichtete Immobilisierung einer Lipase (AB457187), mit Hilfe des Aldehyd-tags möglich ist. Mit dieser Technik wurde eine bis zu dreifach erhöhte spezifische Aktivität des Immobilisats, im Vergleich zur Immobilisierung der Lipase mit Glutaraldehyd erreicht.^[23] Die Erkennungssequenz LCTPSR für FGE wurde C-terminal in der Lipase platziert. Nach Ko-Expression mit mtbFGE konnte der Aldehyd für die Immobilisierung eingesetzt werden. FGly wurde über eine Schiffsche-Base an einem mit Aminogruppen funktionalisierten *mesocellular siliceous foam* (MCF)^[263] gebunden. Weiterhin konnte eine Dehalogenase mit dieser Technik immobilisiert und stabilisiert werden.^[24]

Zur selektiven Einführung des Aldehyd-tags in mtbFGE wurde die Konsensussequenz LCTPSR mittels Mutagenese-PCR in die Thrombin-Schnittstelle von pET 14b mtbFGE eingefügt. Während der Expression von mtbFGE sollte so die direkte Konversion von Cystein zu FGly erfolgen. Tabelle 6-7 zeigt einen Ausschnitt der Sequenzierungsergebnisse des Wildtyps und der erzeugten Variante.

Tabelle 6-7 Sequenz des mtbFGE Wildtyps und der Variante für die ortsgerichtete Immobilisierung: Der Sequenzausschnitt zeigt den N-Terminus des Enzyms mit His₆-tag (Blau) und Aldehyd-tag (Rot)

Enzym	Sequenz
mtbFGE Wildtyp	MGSSHHHHHSSG-----VPRGSHMLTELVDL
mtbFGE Variante	MGSSHHHHHSSGLCTPSRVPRGSHMLTELVDL

Im Anschluss an die erfolgreiche Einführung der Mutation wurde das Fusionsprotein mtbFGE-LCTPSR exprimiert. Als Kontrolle wurde der Wildtyp mit dem gleichen Protokoll exprimiert. Nach Reinigung mittels IMAC-Affinitätschromatographie wurde für den Wildtyp eine Ausbeute von 17.8 mg pro Liter Kulturmedium und für die LCTPSR-Variante eine Ausbeute von 8.4 mg pro Liter erzielt. Die Sequenz LCTPSR zeigte keinen negativen Einfluss auf die Interaktion mit der stationären Phase der für die IMAC eingesetzten Säule. Wildtyp und Variante eluierten bei gleichen Imidazolkonzentrationen im Bereich von 130-167 mM Imidazol.

Um zu überprüfen, ob FGly erfolgreich generiert wurde, wurde ein tryptischer Verdau mit anschließender MALDI-ToF-MS Analyse durchgeführt. Zum einen wurde eine HCCA-Matrix und zum anderen eine 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Matrix (2,4-DNPH) eingesetzt, um die Oxidation von Cystein zu FGly zu beweisen. Bei der Ko-Kristallisation mit der HCCA-Matrix konnte die Massendifferenz von 18.02 m/z

zwischen Cystein und FGly detektiert werden. 2,4-DNPH wurde für den selektiven Nachweis von Aldehydpeptiden eingesetzt, da während Ko-Kristallisation und Ionisierung ein Hydrazon-Addukt mit dem gesuchten FGly-Peptid entsteht. Diese Modifizierung erhöht die Sensitivität, da sich das Ionisierungsverhalten der Hydrazon-Addukte deutlich von denen der Cystein-Peptide unterscheidet.^[149] Die Massendifferenz zwischen Hydrazon und Cystein-Peptid liegt bei 180.12 m/z. Abbildung 6-49 zeigt einen Ausschnitt der MALDI-ToF-MS Analyse unter Verwendung der 2,4-DNPH-Matrix.

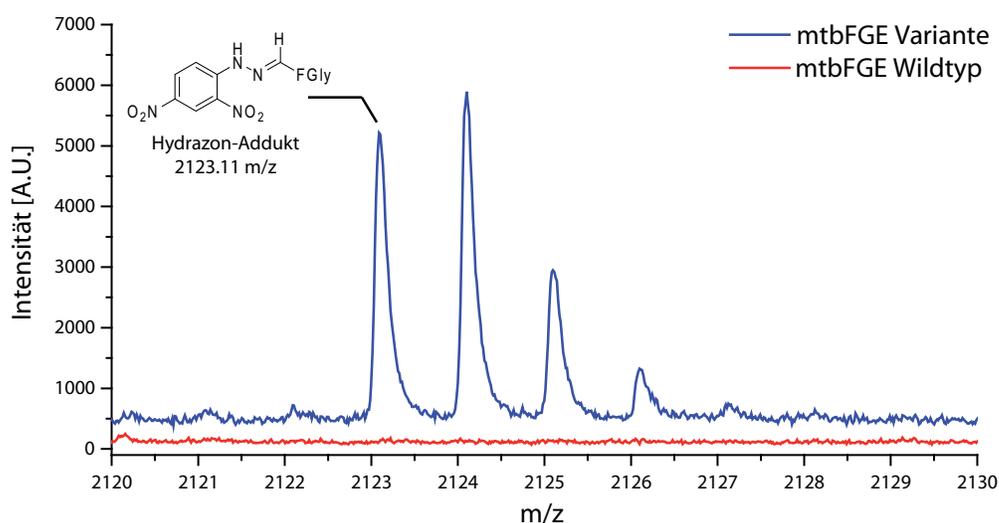


Abbildung 6-49 Tryptischer Verdau mit anschließender MALDI-ToF-MS Analyse: Nach dem tryptischen Verdau von mtbFGE-Wildtyp (Rot) und der LCTPSR-Variante (Blau) wurden die Peptide durch MALDI-ToF-MS detektiert. Für das Spektrum wurde eine 2,4-DNPH-Matrix eingesetzt. Das Hydrazon-Addukt von FGly für das Peptid GSSHHHHHHSSGL(FGly)TPSR zeigt ein eindeutiges Signal bei 2123.11 [M+H]⁺. Für dieses Fragment wurde eine Masse von 2122.85 [M+H]⁺ berechnet.

Das Hydrazon-Addukt von FGly für das Peptid GSSHHHHHHSSGL(FGly)TPSR kann nur im Spektrum der Variante gefunden werden. Das signifikante Signal bei 2123.11 [M+H]⁺ belegte die erfolgreiche Generierung des Aldehyds. Zusätzlich konnte mit der HCCA-Matrix das gleiche FGly-Peptid bei 1942.11 [M+H]⁺ im Spektrum der Variante detektiert werden. Als Kontrolle, dass es sich bei diesen Signalen um kein anderes Peptid aus dem tryptischen Verdau handelt, ist ebenfalls das Spektrum des Wildtyps gezeigt.

Um sicher zu stellen, dass die Mutation keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität von mtbFGE ausübt, wurde die Variante mit dem Wildtyp verglichen. Abbildung 6-50 zeigt das Ergebnis dieser Messung. Der 30 Minuten Wert wurde für die Berechnung der spezifischen Aktivität verwendet. Diese liegt bei 53.39 ± 0.65 mU/mg (n=3). Der Vergleich mit der bestimmten spezifischen Aktivität für den Wildtyp (63.56 ± 1.68 mU/mg (n=3)) aus Abschnitt 6.2.3 zeigt dass die Abweichung gering ist. Da es sich um mtbFGE und mtbFGE-LCTPSR aus verschiedenen Expressionen und Aufreinigungen handelt sind leichte Abweichungen normal. Somit hat die Mutation keinen signifikanten Einfluss auf die katalytische Aktivität.

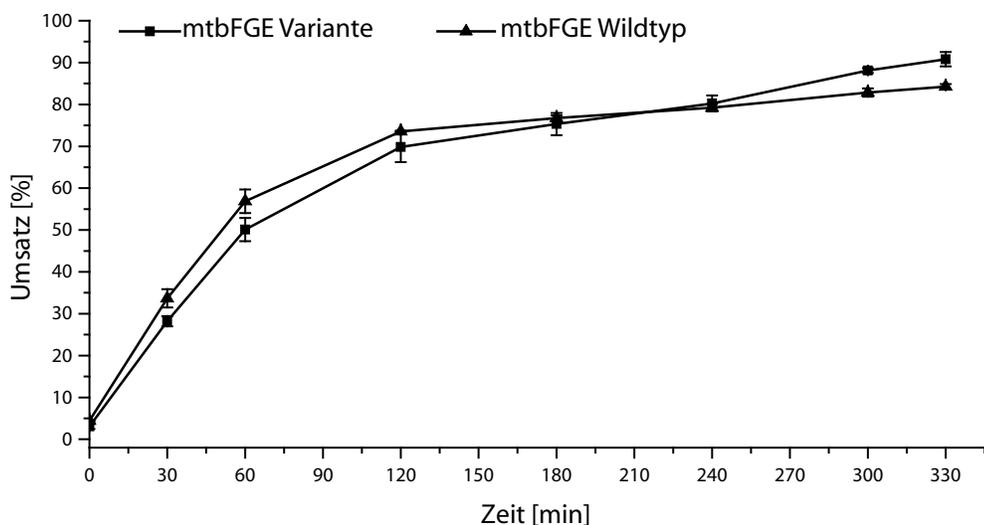


Abbildung 6-50 Vergleich der katalytischen Aktivität von mtbFGE Wildtyp und Variante: Dargestellt ist der Umsatz in % von 500 μg Peptid **70** durch 100 μg mtbFGE. ($n=3$) Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und per RP-HPLC analysiert. Die Kurven der Variante und des Wildtyps sind nahezu identisch.

Als feste Phase wurde als Alternative zu dem *mesocellular siliceous foam* (MCF)^[263] ein Harz (HA403, RESINDION) mit freien Aminen auf der Oberfläche gewählt. In Kapitel (6.1.7) wird die Synthese des Knoevenagel-Bausteins **43** für die Konjugation mit FGly beschrieben. Das Harz wurde mittels einer Amidbindung mit **43** derivatisiert, damit über die *trapped*-Knoevenagel-Konjugation eine stabile Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung mit dem Aldehyd ausgebildet werden konnte. Nach Reinigung der mtbFGE-L(FGly)TPSR Variante wurde das Enzyms mit dem derivatisierten Harz **83** inkubiert. Vor Zugabe des Harzes **83** wurden Proben vom Überstand genommen, sowie nach der Immobilisierung. Die Proben wurden dann per SDS-PAGE analysiert um zu überprüfen, ob mtbFGE-L(FGly)TPSR an das Harz **83** bindet. Das Gel (vgl. Abbildung 6-51) zeigt in allen sechs Spuren Banden bei etwa 35 kDa, bei denen es sich um mtbFGE-L(FGly)TPSR handelt. Es wurden jeweils drei verschiedene Proteinmengen geladen, um zu evaluieren, wie viel der Variante vom Harz **83** gebunden werden kann. Der Vergleich der Spuren vor und nach der Inkubation mit dem *trapped*-Knoevenagel-Harz **83** verdeutlicht, dass die Immobilisierung erfolgreich war, jedoch wurde relativ wenig mtbFGE-L(FGly)TPSR gebunden. Es wurden für dieses Experiment 1 mg mtbFGE-L(FGly)TPSR und 600 mg *trapped*-Knoevenagel-Harz **83** eingesetzt. Um bei weiteren Experimenten den Anteil an immobilisiertem mtbFGE-L(FGly)TPSR zu erhöhen könnte mehr Harz verwendet werden. Das Harz (HA403) wurde in diesem Experiment mit 21 mg (0.041 mmol) des *trapped*-Knoevenagel-Bausteins **43** derivatisiert und es wurde HATU zur Bildung der Amidbindung eingesetzt. Wie in Abschnitt 6.1.7 diskutiert, konnten bei der Kupplung von Amidbindungen am Pyrazolon **38** mit HATU nur geringe Ausbeuten erreicht werden, daher ist davon auszugehen, dass der Beladungsgrad des Harzes **83** gering war. Für weitere Experimente sollten die Reaktionsbedingungen dieses Schritts optimiert werden. Eine Möglichkeit könnte die Verwendung eines NHS- oder PFP-Aktivesters des *trapped*-Knoevenagel-Bausteins **43** sein. Bei der Immobilisierung von mtbFGE-

L(FGly)TPSR mit dieser Technik ist es weiterhin wichtig, dass die *trapped*-Knoevenagel-Einheiten mit dem Enzym in einer hohen Ausbeute reagiert. Wenn Affinitätsgruppen frei bleiben, ist es möglich, dass das gewünschte Produkt über die Aldehyd-Funktionalität an das Harz **83** gebunden wird. Optional könnten die restlichen freien Bindungsstellen nach der Immobilisierung von mtbFGE-L(FGly)TPSR mit einem niedermolekularen Aldehyd geblockt werden.

Nachdem das Harz mit Bicin-Puffer gewaschen wurde, wurde ein Aktivitätstest mit Substratpeptid P3 durchgeführt. Das Peptid wurde in Bicin-Puffer mit Kupfersulfat gelöst und mit dem Harz inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und durch den RP-HPLC-Assay analysiert. Abbildung 6-51 zeigt die Ergebnisse des Aktivitätstests. Nach 24 h Inkubation wurde ein Umsatz von 80.1 % erreicht. Somit ist die Immobilisierung von katalytisch aktiven mtbFGE-L(FGly)TPSR mit dieser Technik möglich. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Harzes und der Effizienz der Immobilisierung sind weitere Experimente nötig. Diese Technik könnte einen großen Vorteil für die Produktion von aldehydhaltigen Peptiden mit sich bringen, da Reinigung und Immobilisierung des Enzyms in einem Schritt durchgeführt werden könnten. Die Immobilisierung der mtbFGE-L(FGly)TPSR Variante wär auch mit dem Protokoll von A. Wang *et al.* über einen MCF-Träger möglich.^[23] Für die Immobilisierung von humanem FGE ist dieses Protokoll jedoch nicht geeignet, da bei der Reduktion der Schiffischen Basen mit Natriumcyanoborhydrid die strukturellen Disulfidbrücken ebenfalls reduziert werden. (Abschnitt 2.3.1)

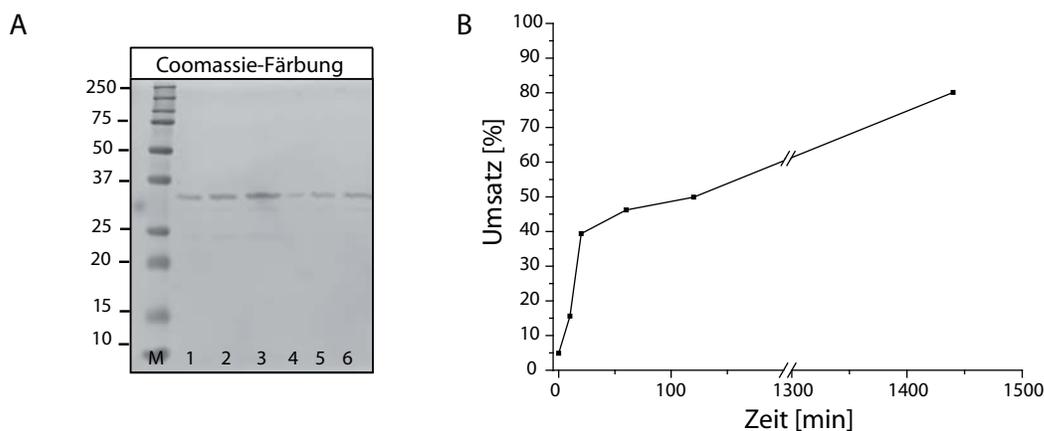


Abbildung 6-51 Immobilisierung von mtbFGE über den FGly-tag: (A) In einer SDS-PAGE wurde die mtbFGE Variante vor Zugabe des *trapped*-Knoevenagel Harzes **83** und nach Inkubation mit dem Harz analysiert. In Spur 1 wurden 5 µL, 0.25 µg mtbFGE Variante aufgetragen. Spur 2 (10 µL, 0.5 µg) Spur 3 (15 µL, 0.75 µg). Nach der Inkubation mit dem Harz für 17 h wurden erneut Proben vom Überstand mit gleichen Volumina entnommen und analysiert. Spur 4 (5 µL) Spur 5 (10 µL), Spur 6 (15 µL). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität der Banden abnimmt. (B) Dargestellt ist der Umsatz in % von 500 µg Peptid **68** durch Immobilisiertes mtbFGE. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und per RP-HPLC analysiert.

6.2.6 Charakterisierung der aldehydhaltigen Peptide

Unter Einsatz von mtbFGE konnten quantitative Mengen Cystein-Peptid zum Aldehyd-Peptid oxidiert werden (vgl. Abschnitt 6.2.4.), nach der Biotransformation und Reinigung mittels RP-HPLC wurden die Aldehyd-Peptide **71**, **72** und **73** im Milligramm Maßstab isoliert. Anschließend wurde die spektroskopische Charakterisierung dieser Peptide vorgenommen, wobei im Mittelpunkt die Frage stand, in welcher Form FGly vorliegt. In Arbeiten von L. M. Azofa *et al.* wurde für Glykolaldehyd gezeigt, dass in wässriger Lösung sowohl Aldehyd als auch Enol sowie das Hydrat vorliegen.^[264] Für andere Aldehyde wie Formaldehyd ist bekannt, dass das Gleichgewicht in wässriger Lösung zu fast 100 % auf Seite des Methandiols liegt.^[265] Auch für FGly ist aufgrund der Kristallstruktur der ASA bekannt, dass diese Aminosäure als Aldehydhydrat vorliegen kann.^[26] Basierend auf diesem Isomer von FGly wurde der Umesterungs-Eliminierungs-Mechanismus für die Enzymklasse der Sulfatasen postuliert (vgl. Abschnitt 2.3.3).^{[61][266]} Daher ist es wahrscheinlich, dass die FGly-Seitenkette in den Aldehyd-Peptiden im Gleichgewicht mit dem korrespondierenden geminalen Diol vorliegt.

Charakterisierung der aldehydhaltigen Peptide durch Massenspektrometrie

Das Aldehyd-Peptid **71** wurde durch Massenspektrometrie analysiert. Hierbei wurde sowohl das Diol von FGly als auch der Aldehyd nachgewiesen, was auf ein dynamisches Gleichgewicht beider Formen schließen lässt. Während der RP-HPLC konnten Isomere des Aldehyd-Peptids **CS1** aufgetrennt werden und durch die gekoppelte hochauflösende Massenspektrometrie identifiziert werden. Das Signal bei 1263.656 m/z konnte dem Molekülion $[M+2H]^{2+}$ (Berechnet: 1263.655 m/z) des Diols zugeordnet werden und das Signal bei 836.7691 m/z dem Molekülion $[M+3H]^{3+}$ (Berechnet: 836.7692 m/z) des Aldehyds.

Das Aldehyd-Peptid **71** wurde im Folgenden in $dH_2^{16}O$ oder $dH_2^{18}O$ gelöst und durch MALDI-ToF-MS analysiert (vgl. Abbildung 6-52). Die Probe, welche in $dH_2^{16}O$ gelöst wurde, zeigt ein Signal bei 1544.92 m/z $[M+H]^+$. Die Isotopenverteilung stimmt mit der berechneten Verteilung überein. Im Gegensatz dazu konnte bei der Probe welche in $dH_2^{18}O$ inkubiert wurde ein deutliches Signal bei 1547.05 m/z $[M+H]^+$ detektiert werden. Dieses Signal belegt, dass ^{18}O in das Peptid eingebaut wurde. Durch das Gleichgewicht zwischen Aldehyd und Diol kommt es zur Hydratisierung von FGly durch $H_2^{18}O$. Durch die Ko-Kristallisation im Vakuum wird Wasser aus dem Gleichgewicht entzogen, wodurch nur der Aldehyd vorliegt und eine Mischung aus **71** mit ^{18}O und ^{16}O entsteht.

Insgesamt belegt die Charakterisierung der aldehydhaltigen Peptide durch Massenspektrometrie, dass die Diol-Form von FGly im Gleichgewicht mit der Aldehyd-Form vorhanden ist. Eine Quantifizierung durch Massenspektrometrie ist jedoch nicht möglich, daher kann durch diese Daten keine Aussage getroffen werden, welche der Formen bevorzugt vorliegt.

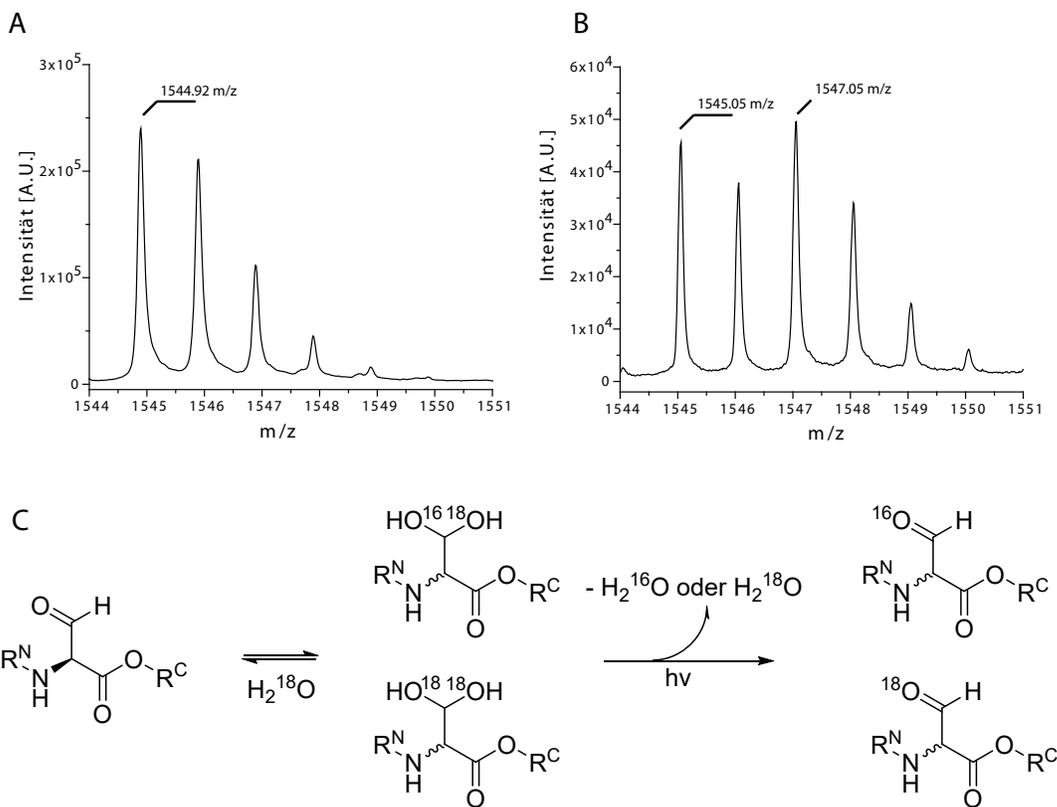


Abbildung 6-52 MALDI-ToF Spektrum von Aldehyd-Peptid **71**: Das Peptid **71** wurde in dH₂¹⁶O oder dH₂¹⁸O gelöst und für eine Stunde bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben mit einer HCCA-Matrix im Vakuum ko-Kristallisiert und per MALDI-ToF-MS analysiert. Die Isotopenverteilung in (A) entspricht der berechneten Isotopenverteilung für **71** mit den relativen Intensitäten 100/73.5/26.6/6.3.^[267] Im Spektrum (B) ist das Signal bei 1547.05 m/z deutlich intensiver. (C) Zeigt einen möglichen Mechanismus, wie das ¹⁸O-Isotop durch das Gleichgewicht zwischen Aldehyd und Diol in das Peptid **71** eingebaut wurde.

Charakterisierung der Aldehyd-Peptide durch IR-Differenzspektroskopie

Das Gleichgewicht zwischen Aldehyd- und Diol-Form in wässriger Lösung ist für die Konjugationschemie mit FGly von besonderem Interesse, da der elektrophile Aldehyd für bioorthogonale Reaktionen mit Proteinen und Peptiden benötigt wird. Um den relativen Anteil der Aldehyd- und Diol-Form zu quantifizieren, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe T. Kottke IR-Doppeldifferenzspektren von Peptid **71** aufgenommen. Das Cystein-Peptid **68** und Aldehyd-Peptid **71** wurden in gleicher Konzentration in dH₂O gelöst und es wurde ein IR-Differenzspektrum gegen dH₂O aufgenommen, um den Hintergrund zu subtrahieren (vgl. Abbildung 6-53 A).

Aldehyde sollten charakteristische Signale bei 1768 cm⁻¹ bis 1720 cm⁻¹ aufgrund der C=O-Valenzschwingung erzeugen.^[268] Da diese Carbonyl-Schwingungen nur schwer von Ketonen zu unterscheiden sind und Amidbindungen Banden bei 1680 cm⁻¹ bis 1630 cm⁻¹ zeigen, ist die O=C-H-Deformationsschwingung bei 1410 cm⁻¹ bis 1380 cm⁻¹ für die Quantifizierung von FGly in der Aldehyd-Form entscheidend.^[268] Die Spektren von **71** und **68** zeigen deutliche Banden zwischen 1700 cm⁻¹ und 1600 cm⁻¹ für

die Amidbindungen der Peptide, jedoch ist kein Signal für Carbonyl-Schwingungen zu erkennen. Weiterhin sind keine Banden für O=C-H-Deformationsschwingungen zu sehen. Nur bei Wellenzahlen zwischen 1100 cm^{-1} bis 900 cm^{-1} sind signifikante Unterschiede in den Spektren zu erkennen.

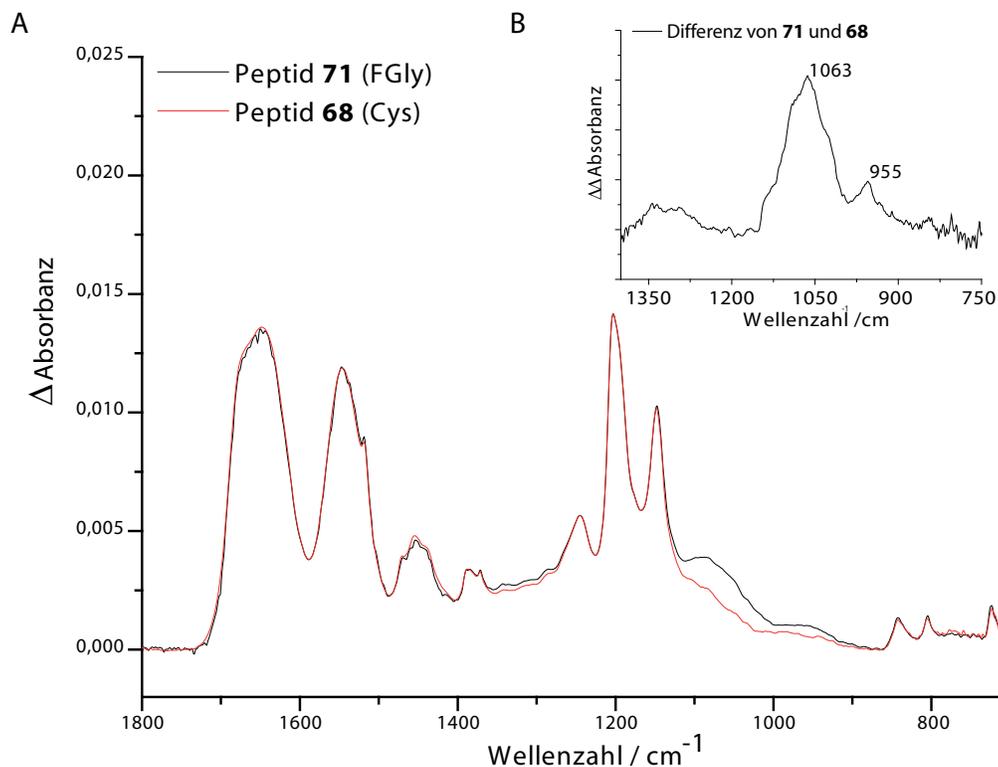


Abbildung 6-53 (A) Differenzspektren der Peptide **68** (Rot) und **71** (Schwarz) aufgenommen von K. Sommer. Bei den Spektren handelt es sich um Differenzspektren gegen dH_2O . (B) zeigt das Doppeldifferenzspektrum von Peptid **68** gegen **71**.

Abbildung 6-53 (B) zeigt die Unterschiede von Peptid **68** und **71** in einem Doppeldifferenzspektrum. Diese Auftragung verdeutlicht, dass Peptid **71** Banden bei 1063 cm^{-1} und 955 cm^{-1} zeigt. Um zu untersuchen, woher diese Schwingungen stammen, wurden von K. Sommer IR-Spektren für FGly in der Diol- und Enol-Form, mit der Software GAUSSIAN berechnet (vgl. Abbildung 6-54).^[269] Das theoretische Spektrum der Diol-Form zeigt signifikante Signale bei 1036 cm^{-1} und 982 cm^{-1} in guter Übereinstimmung mit dem Doppeldifferenzspektrum der Peptide **68** und **71**. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass FGly überwiegend in der Diol-Form vorliegt. Andere Spektren von literaturbekannten Diolen unterstützen diese These. 2,2,2-Trichlor-1,1-ethandiol ist ein stabiles Aldehydhydrat und zeigt im IR-Spektrum Banden bei 1039 cm^{-1} und 972 cm^{-1} .^[270] Der negative induktive Effekt (-I) der drei Chloratome destabilisiert die Aldehydform und die Gleichgewichtskonstante K_{eq} liegt bei $2.8 \cdot 10^4$ zu Gunsten des Diols.^[271]

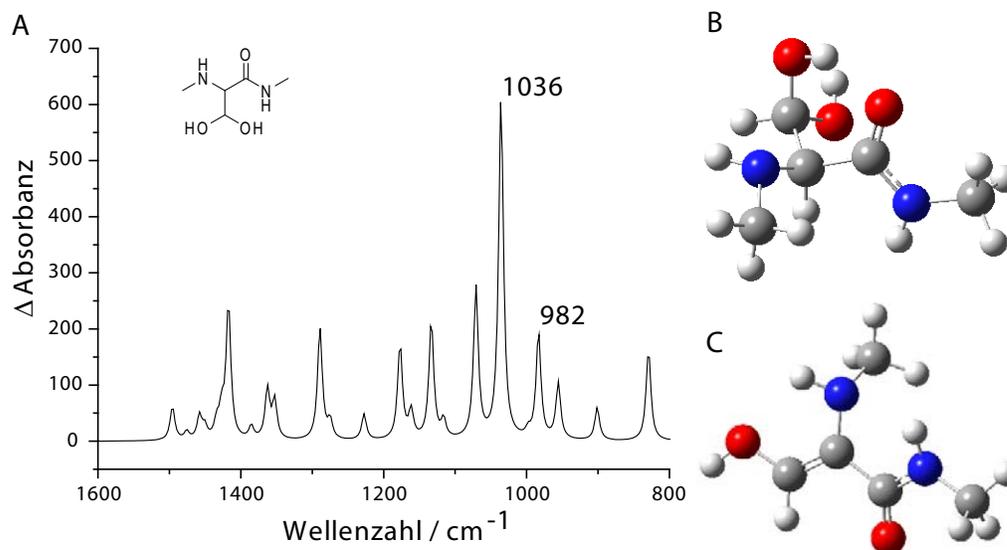


Abbildung 6-54 FGly in der Diol- (B) und Enol-Form (C) berechnet mit der Software GAUSSIAN. Das theoretische Spektrum des Diols zeigt signifikante Signale bei 1036 cm^{-1} und 982 cm^{-1} . Die Rechnungen wurden von K. Sommer aus der Arbeitsgruppe von T. Kottke (Universität Bielefeld) durchgeführt.

Charakterisierung der Aldehyd-Peptide durch NMR-Spektroskopie

Die Charakterisierung des Aldehyd-Peptids **71** durch IR-Spektroskopie ergab, dass das Gleichgewicht zwischen Aldehyd- und Diol-Form von FGly auf Seiten des Diols liegt. Für eine abschließende Quantifizierung wurde das sieben AS lange Aldehyd-Peptid **73** NMR-spektroskopisch untersucht. Es wurden ^1H , ^{13}C , TOCSY, ROESY und HSQC NMR-Spektren in $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ bei einem pH Wert von 5 aufgenommen. Die Protonensignale konnten mit Hilfe dieser Spektren zugeordnet werden (vgl. Tabelle 8-1).

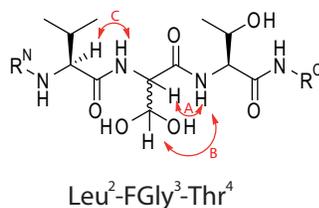


Abbildung 6-55 NOE-Korrelationen von Peptid **73**: Das Kreuzsignal im ROESY-Spektrum bei 8.26 ppm/4.40 ppm konnte dem NOE zwischen Thr H^N und FGly H^α zugeordnet werden. Weiterhin ist ein NOE-Signal bei 8.26 ppm/5.29 ppm zwischen Thr H^N und FGly H^β zu erkennen. FGly H^N zeigt ein weiteres NOE-Signal zu Leu H^α bei 8.18 ppm/4.43 ppm

Abbildung 6-56 zeigt das ^1H -Spektrum von Peptid **73**. Für einen Aldehyd ist ein Protonensignal im ^1H -Spektrum zwischen 9.5 ppm und 10.5 ppm und ein Kohlenstoffsignal im ^{13}C -Spektrum zwischen 190 ppm und 200 ppm zu erwarten.^[272] Im gezeigten Spektrum ist dieses Signal bei 9.56 ppm zu erkennen, welches dem H^β-Atom der Aldehydform von FGly zugeordnet werden konnte. Weiterhin wurde das Signal bei

5.29 ppm aufgrund der 2D-NMR-Experimente eindeutig dem H^{β} -Proton der Diol-Form zugeordnet. Abbildung 6-55 zeigt die NOE-Korrelationen zwischen dem 1,1-Diol von FGly und den benachbarten Aminosäuren Leu² und Thr⁴. Für die Enol-Form von FGly wurde ein H^{β} Protonensignal bei 6 ppm und ein C^{β} -Kohlenstoffsignal bei zirka 135 ppm erwartet. In diesem Bereich der chemischen Verschiebung wurde jedoch kein passendes Signal identifiziert. In den Arbeiten von V. Bertolasi *et al.* wurde beschrieben, dass Wasserstoffbrückenbindungen des Enols auch dazu führen können, dass das Protonensignal tieffeldverschoben ist.^[273] Somit könnte das Dublett bei 7.67 ppm im 1H -Spektrum und bei 152 ppm im ^{13}C -Spektrum dem Enol zugeordnet werden.

Das Signal der Methylengruppe der Acetyl-Gruppe, bei einer chemischen Verschiebung von 1.95 ppm, sowie die Signale für die H^{δ} - Protonen der Aminosäure Leu² bei 0.89 ppm und 0.84 ppm wurden als Referenz für die Intensität der übrigen Protonensignale eingesetzt. Das Integral von H^{β} der Aldehyd-Form von FGly beträgt 0.02, somit liegt nur ein sehr geringer Anteil von Peptid **73** als Aldehyd vor. Im Vergleich hierzu belegt das Integral von 0.87 für H^{β} der Diol-Form, dass FGly zu etwa 87 % hydratisiert vorliegt. Das postulierte Signal für das Enol zeigt ein Integral von 0.06 somit könnten 6 % von Peptid **73** in der Enol-Form vorliegen.

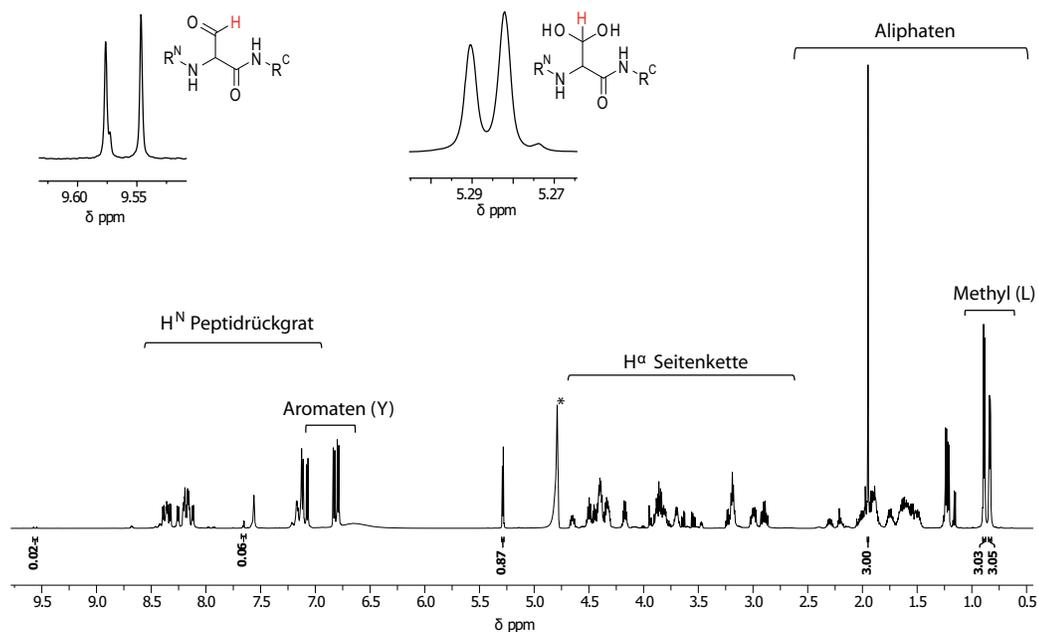


Abbildung 6-56 1H -NMR Spektrum von Peptid **73** aufgenommen in H_2O/D_2O 90/10 bei einem pH-Wert von 5. Die Signale für FGly in der Diol- und Aldehyd-Form sind vergrößert dargestellt. Es liegt ein doppelter Signalsatz vor.

Weiterhin ist in Abbildung 6-56 deutlich zu erkennen, dass ein doppelter Signalsatz vorliegt. Dies wird besonders bei den Signalen von FGly deutlich, wie im Ausschnitt für das Diol- H^{β} und Aldehyd- H^{β} Signal zu sehen ist. Höchstwahrscheinlich kommt es zu einer Racemisierung von FGly wodurch ein Diastereomergemisch entsteht.

Basierend auf den Ergebnissen der NMR-Untersuchung, welche andeuten, dass die Enol-Form von FGly eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet und den Arbeiten von

V. Bertolasi *et al.*, in denen gezeigt wurde, dass das Enol von β -Diketonen durch intramolekulare sechsgliedrige Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert wird, wurde folgender Mechanismus für die Racemisierung der Aldehyd-Peptide postuliert (vgl. Abbildung 6-57) Zunächst könnte das Enol durch eine Tautomerisierung gebildet werden, wobei es durch die Rückreaktion zu der Racemisierung von FGly kommt. Da durch die Wasserstoffbrückenbindung ein sechsgliedriger Ring gebildet wird, könnte dieser Übergangszustand von FGly stabilisiert sein und die die Hydratisierung zum Diol erleichtern. Durch eine folgende nukleophile Addition von Wasser könnte anschließend das geminale Diol gebildet werden.

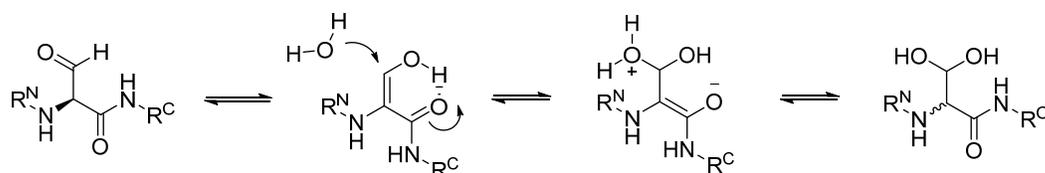


Abbildung 6-57 Postulierter Mechanismus für die Racemisierung und Hydratisierung von FGly: Zunächst bildet sich das Enol, das durch eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert wird. Durch die nukleophile Addition von Wasser wird dann das Aldehydhydrat gebildet.

Um zu untersuchen, wie sich das Gleichgewicht zwischen Diol, Enol und Aldehyd verändert, wenn organische Lösungsmittel eingesetzt werden, wurden 2D-NMR Spektren von Peptid **73** in DMSO- d_6 aufgenommen. Abbildung 6-58 zeigt das HSQC-Spektrum von Peptid **73** in D_2O/H_2O sowie in DMSO- d_6 . Hierbei wird deutlich, dass sich das Gleichgewicht zwischen Diol und Aldehyd stark verschiebt. In wässriger Lösung liegen nur 2 % von FGly als Aldehyd und 87 % in der Diol-Form vor. Unter wasserfreien Bedingungen in organischer Lösung liegt das Gleichgewicht auf Seiten der Aldehyd und Enol-Form.

Insgesamt konnte durch die Charakterisierung der Aldehyd-Peptide **71** und **73** durch Massenspektrometrie, Infrarotspektroskopie und NMR-Spektroskopie erfolgreich gezeigt werden, dass ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den FGly-Formen vorliegt. Die Keto-Enol-Tautomerie der Aldehyd- und Enol-Form von FGly ist Ursache für die Racemisierung am C^α . Da es sich bei FGly um ein 1,3-Glutarsäurederivat handelt, scheint dies unvermeidbar zu sein.

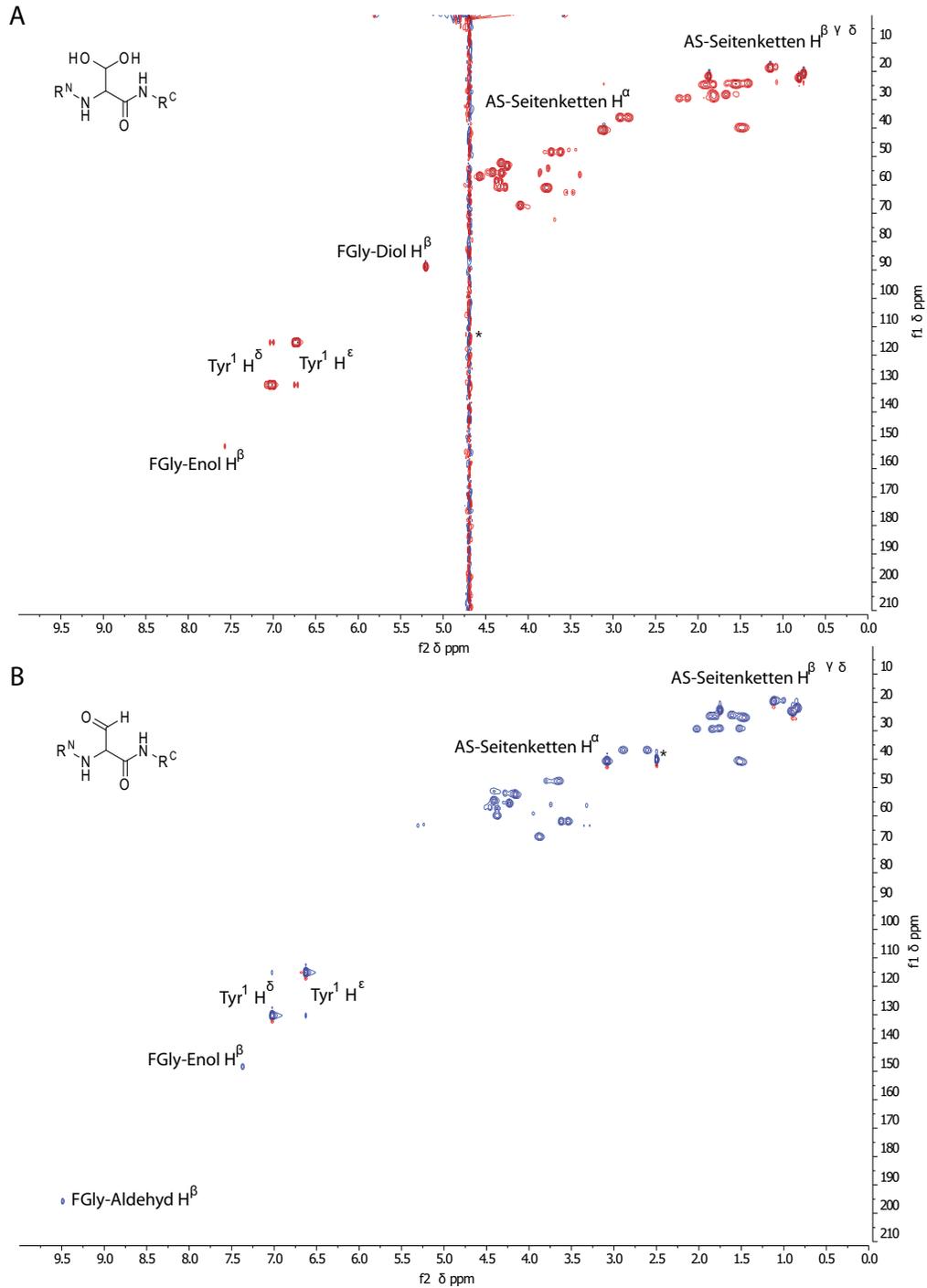


Abbildung 6-58 HSQC Spektren von Peptid 73 aufgenommen in (A) D_2O/H_2O^* und (B) $DMSO-d_6^*$: (A) Die Signale von H^β und C^β des Diols, bei einer chemischen Verschiebung von f_2 5.29 ppm, f_1 89 ppm sowie die Signale von H^β und C^β des Enols bei f_2 7.67 ppm und f_1 152 ppm sind gut zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist in (B) ein deutliches Signal bei f_2 9.49 ppm und f_1 196 ppm für die Aldehydform von FGly zu erkennen, was den Einfluss des Lösungsmittels auf das Diol-Aldehyd-Gleichgewicht beweist.

6.2.7 Wittig-Reaktionen mit aldehydhaltigen Peptiden

Die C^α-Formylglycin-generierenden Enzyme (FGE) aus *Homo sapiens* (ΔFGE) und *Mycobacterium tuberculosis* (mtbFGE) wurden für die Synthese aldehydhaltiger Peptide erfolgreich eingesetzt, wodurch die Cystein-Peptide **68**, **69** und **70** zum Aldehyd oxidiert wurden. Die Carbonylgruppe dieser Aldehyde ist aufgrund ihrer Reaktivität als Elektrophil für die Peptidchemie besonders interessant, da die Seitenketten der übrigen proteinogenen Aminosäuren z. B. von Lysin oder Cystein nukleophile funktionelle Gruppen enthalten.

Die Aldehyd-Peptide **71**, **72** und **73** wurden in Wittig-Reaktionen mit stabilisierten Yliden umgesetzt, um zu untersuchen, ob durch diese chemoenzymatische Synthesestrategie Peptide mit neuen funktionellen Gruppen synthetisiert werden können. In der konventionellen Lösungssynthese bzw. Festphasensynthese können solche Gruppen nur unter großem Schutzgruppenaufwand synthetisiert werden. So zeigten die Arbeiten von J. Rush *et al.*, dass für die Synthese eines Fmoc-FGly Bausteins sechs Stufen chemische Synthese notwendig sind.^[173]

Perspektivisch könnten nach Etablierung der Grundlagen anhand der Modellpeptide **71**, **72** und **73** komplexe Peptide wie z.B. Conotoxine^[274], Cyclotide^[275] und Lantibiotica^[276] modifiziert werden. Dabei könnte es gelingen, vor allem synthetisch sehr anspruchsvolle Peptide mittlerer Länge gezielt an der FGly-Seitenkette für Struktur-Wirkungsbeziehungen zu derivatisieren.

Die Synthese der Ylide wurde in Abschnitt 6.1.8 beschrieben. In Arbeiten von M. J. Han *et al.* wurden durch die Oxidation von Serin mit NaIO₄ N-terminale Aldehyde in Proteinen erzeugt, welche dann in wässriger Lösung mit stabilisierten Yliden umgesetzt werden konnten.^[108] Diese Reaktionsbedingungen wurden für Wittig-Reaktionen mit den FGly-Peptiden **71**, **72** und **73** angewendet, jedoch konnten nur Spuren des Produktes durch Massenspektrometrie detektiert werden. Wie in der Literatur beschrieben, wurde ein Lösemittelgemisch aus H₂O/*tert*-BuOH bei pH 8 eingesetzt.^[108] Die NMR-spektroskopische Untersuchung von Peptid **73** liefert eine mögliche Erklärung, warum in wässriger Lösung nur Spuren des Produktes erhalten wurden (vgl. Abbildung 6-59). Nur die Aldehyd-Form von FGly führt zu Produkt **75**, da jedoch nur ein sehr geringer Anteil von FGly als Aldehyd vorliegt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Produktbildung sehr langsam. Da nach der Reaktion von **73** zu **75** jedoch die Rückreaktion nicht möglich ist und durch das Gleichgewicht zwischen Aldehyd und Diol der Aldehyd nachgebildet wird, sollte ein vollständiger Umsatz möglich sein. Jedoch führte die Erhöhung der Reaktionszeit auf bis zu 48 Stunden zu keinen besseren Ausbeuten. Dies könnte dadurch begründet werden, dass die eingesetzten Ylide in wässriger Lösung nicht über einen längeren Zeitraum stabil sind.^[277] In LC-MS Untersuchungen wurde Triphenylphosphanoxid nachgewiesen, was ein deutlicher Hinweis für die Hydrolyse von Ylid **74** ist. Daher wurde in weiteren Ansätzen schrittweise die Menge an eingesetztem Ylid **74** auf bis zu 50 Äquivalente erhöht. Auch diese Anpassung der Reaktionsbedingungen führte zu keinem isolierbaren Produkt.

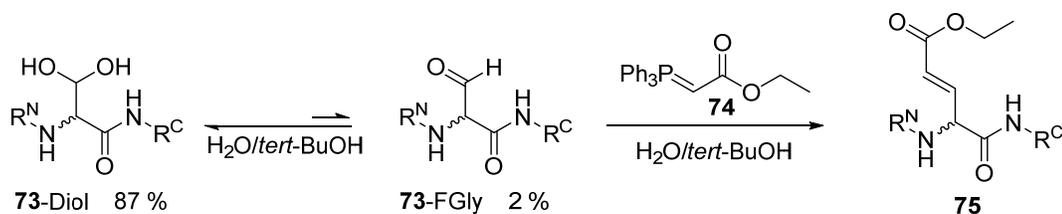


Abbildung 6-59 Synthese von Peptid **75** mit Ylid **74** in wässriger Lösung. Das Edukt Peptid **73** liegt nur zu einem geringen Teil als Aldehyd vor.

Daher wurden für die folgenden Reaktionen organische Lösungsmittel eingesetzt. Dabei war es wichtig, ein Lösungsmittel zu verwenden, in dem sowohl das unpolare Ylid **74** als auch das polare Peptid **73** eine gute Löslichkeit besitzen (vgl. Tabelle 6-8).

Tabelle 6-8 Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen für die Wittig-Reaktion von **73** mit Ylid **74**. (*) Schrittweise Zugabe von Ylid **74** im Laufe der Reaktion (°) Ausbeute an Rohprodukt (i) Isoliertes Produkt **75**.

#	Lösungsmittel	Zeit [h]	Temperatur	Äq. 74	Konz. 73	Ausbeute
1	DMF	3	RT	5	0.5 mM	Spuren
2	Dioxan	2	RT	3	10 mM	6% ^c
3	EtOH abs.	2.5	RT	4	10 mM	83% ^c 71% ⁱ
4	EtOH abs.	2	RT	4*	10 mM	32% ⁱ
5	EtOH abs.	3	4 °C	4*	10 mM	14% ⁱ

Bei den Ansätzen mit Dioxan und DMF als Lösungsmittel wurden nur geringe Umsätze erzielt. Höchstwahrscheinlich war die Konzentration von Peptid **73** für den Ansatz in DMF zu gering gewählt. Für eine abschließende Bewertung, ob sich DMF als Lösungsmittel eignet, sollte die Reaktion mit einer Peptidkonzentration von 10 mM wiederholt werden. A. El-Batta *et al.* stellten fest, dass die Reaktion von stabilisierten Yliden mit *o*-Anisaldehyd oder Zimtaldehyd in Methanol mit den höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten ablief.^[110] Da Ylid **74** nur eine geringe Löslichkeit in Methanol zeigte, wurde Ethanol als Alternative verwendet. Mit diesem Lösungsmittel wurden in Ansatz 3 die besten Ausbeuten erzielt. Da die geringe Stabilität von Ylid **74** in Lösung eine Ursache für geringe Umsätze darstellen könnte, wurde die schrittweise Zugabe des Reaktanden **74** im Verlauf der Reaktion erprobt. Dieser Ansatz führte jedoch zu schlechteren Ausbeuten. Das Chromatogramm der RP-HPLC zeigte bei allen Ansätzen Nebenprodukte. Daher wurde die Reaktion bei 4 °C durchgeführt, um zu evaluieren, ob die Nebenreaktionen durch verringerte Temperatur verhindert werden können. Auch diese Reaktionsbedingungen führten zu sehr geringen Ausbeuten. Höchstwahrscheinlich reicht die Reaktivität der stabilisierten Ylide nicht aus, um bei verringerten Temperaturen das Produkt **75** zu bilden.

Weiterhin handelt es sich bei FGly um eine 1,3-Dicarbonylverbindung mit einem CH-aziden H^α-Proton. Nach der Deprotonierung entsteht ein mesomerie-stabilisiertes Carbanion. Daher könnte es bei der Wittig-Reaktion dazu kommen, dass das Ylid zum Phosphoniumsalz protoniert wird.

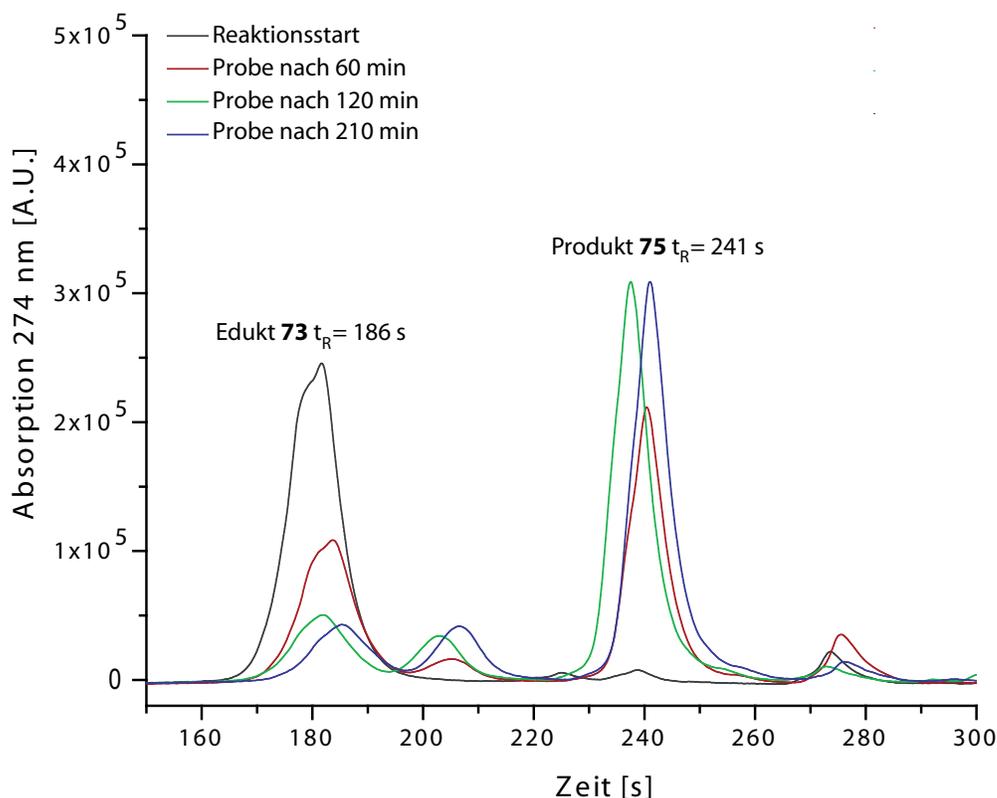


Abbildung 6-60 Reaktionskontrolle mittels RP-HPLC bei 274 nm: Das Edukt **73** zeigt ein breites Signal mit einer Retentionszeit von $t_R = 186$ s. Das Produkt **75** eluiert bei einer Retentionszeit von $t_R = 241$ s.

Abschließend wurde untersucht, ob mit den Reaktionsbedingungen von Ansatz 3 bei längeren Reaktionszeiten die Ausbeute weiter optimiert werden kann. Daher wurde die Produktbildung durch RP-HPLC analysiert (vgl. Abbildung 6-60). Das Edukt **73** zeigt aufgrund der Mischung aus Diol, Enol und Aldehyd ein breites Signal mit einer Retentionszeit von $t_R = 186$ s. In der Probe, welche 60 Minuten nach Reaktionsstart analysiert wurde, ist ein neues Signal mit einer Retentionszeit von $t_R = 241$ s zu erkennen. Durch LC-MS Experimente konnte dieses Signal dem Produkt **75** zugeordnet werden. Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden konnte nur noch eine geringe Zunahme an Produkt **75** gemessen werden und es wurde die Bildung von Nebenprodukten beobachtet. Da sowohl die Seitenketten der übrigen Aminosäuren von Edukt **73** und Produkt **75** für die Nebenreaktionen verantwortlich sein könnten, wurde die Reaktion nach drei Stunden mit einem Umsatz von 87 % aufgearbeitet. Nach Reinigung durch RP-HPLC wurde eine Ausbeute von 71 % erzielt.

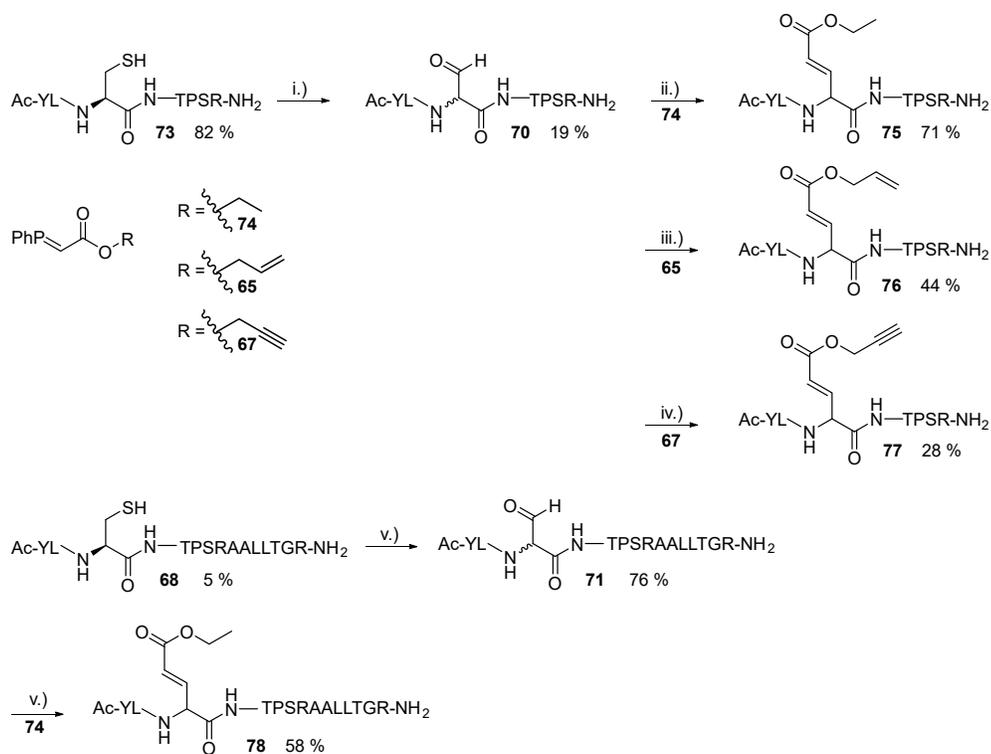


Abbildung 6-61 Wittig-Reaktionen mit Aldehyd-Peptiden: i.) Bicin-Puffer pH 9.3, Arginin 0.2 M, DTT 3 mM, 37°C, 1 mol % mtbFGE. ii.) abs. EtOH, 4 Åq Ylid **74**, 2 h RT. iii.) abs. EtOH, 4 Åq Ylid **65**, 2 h RT. iv.) abs. EtOH, 4 Åq Ylid **67**, 2 h RT. v.) Bicin-Puffer pH 9.3, Arginin 0.2 M, DTT 3 mM, 37°C, 1 mol % mtbFGE. Vi.) abs. EtOH, 4 Åq Ylid **74**, 2 h RT.

In weiteren Reaktionen wurden die Aldehyd-Peptide **71** und **73** mit verschiedenen Yliden umgesetzt. Für diese Reaktionen wurde absolutiertes Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt, um die Bildung des Aldehydhydrates zu verhindern. Abbildung 6-61 zeigt eine Übersicht der durch Wittig-Reaktionen funktionalisierten Peptide. Mit den Yliden **65** und **67** wurden deutlich schlechtere Ausbeuten erzielt. Möglicherweise sind diese Ylide im Vergleich zu Ylid **74** instabiler und es kommt zu einer schnelleren Hydrolyse zu Triphenylphosphanoxid. Wittig-Reaktionen mit dem Aldehyd-Peptid **68**, welches 14 Aminosäurereste enthält, lieferten ebenfalls geringere Ausbeuten. Im Vergleich zum kürzeren Peptid **73** sind hier mehr Seitenketten vorhanden, an denen es zu Nebenreaktionen kommen könnte. Dies würde die geringeren Ausbeuten erklären.

Zusammenfassend wurde eine chemoenzymatische Strategie gefunden, mit der Aldehyd-Peptide durch Wittig-Reaktionen modifiziert werden können. Wittig-Reaktionen mit Aldehyd-Peptiden möglich und bieten im Vergleich zu der etablierten Oxim-Ligation zwei Vorteile. Zum einen wird durch die Wittig-Reaktion eine stabile Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung geknüpft, wodurch stabilere Konjugate möglich sind. Im Vergleich hierzu zeigten Stabilitätstests eines ADCs, welcher durch die Oxim-Ligation funktionalisiert wurde, dass das Konjugat dissoziiert.^[12] Andererseits ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Wittig-Reaktion höher als die der Oxim-Ligation. Reaktionen mit Maytansin-Oxim lieferten nach zwei Stunden Ausbeuten von nur 12%.^[16] In Abschnitt 6.1.2 wurde mit dem Hydroxylamin-PEG-Linker **10** bei der

Bei der Wittig-Reaktion in wässriger Lösung ist die Hydrolyse der stabilisierten Ylide schneller als die Produktbildung ($v_H > v_P$). Daher konnten nur Spuren des gewünschten Produktes detektiert werden. In organischen Lösungsmitteln ist die Konzentration des FGly-Aldehyds höher, somit nimmt v_P zu. Zusätzlich ist die Hydrolyse der Ylide langsamer und insgesamt gilt ($v_H < v_P$). Aus diesen Gründen konnte die Wittig-Reaktion erfolgreich in organischen Lösungsmitteln angewendet werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Wittig-Reaktionen weisen zwei Nachteile auf. Da Konjugationsreaktionen mit Proteinen in wässriger Lösung durchgeführt werden müssen, eignet sich die Wittig-Chemie aufgrund der Hydrolyse der Ylide nicht für die bioorthogonale Proteinkonjugation mit FGly. Nur wenn Aldehyde eingesetzt werden, die nicht dazu neigen das Aldehydhydrat zu bilden, ist die Wittig-Reaktion wie in den Arbeiten von J. Han *et al.* beschrieben, an Proteinen möglich.^[108] Für die chemoenzymatische Funktionalisierung von Peptiden können organische Lösungsmittel eingesetzt werden. Da jedoch die Keto-Enol-Tautomerie zu einer Racemisierung von FGly führt (vgl. Abschnitt 6.2.6), eignet sich diese chemoenzymatische Strategie nicht für die Synthese von Peptiden mit neuen funktionellen Gruppen. Für die biologische Anwendung und Struktur-Wirkungsbeziehungen ist eine definierte Stereochemie am C $^{\alpha}$ -Kohlenstoffatom entscheidend.

6.3 Produktion von FGly Antikörperfragmenten

Im vorherigen Kapitel 6.2 wurde beschrieben, unter welchen Bedingungen Peptide mit FGE erfolgreich zu aldehydhaltigen Peptiden umgesetzt werden können. Aufgrund der spektroskopischen Analyse der aldehydhaltigen Peptide wurde gezeigt, dass die Aminosäure FGly epimerisiert. Für die bioorthogonale Konjugation von synthetischen Molekülen mit Proteinen spielt die Stereochemie jedoch eine untergeordnete Rolle. Somit kann FGE für die Oxidation von Cystein-Resten in Proteinen eingesetzt werden und im Folgenden der racemische Aldehyd für die Kupplung von Fluorophoren oder Zytostatika verwendet werden. Dieses System wird in Arbeiten von D. Rabuka *et al.* für die Herstellung von ADCs angewendet (vgl. Abschnitt 2.6.1.).^[18] Bei der Produktion der für die Chemotherapie zugelassenen ADCs Brentuximab Vedotin (Adcetris) und Trastuzumab Emtansin (Kadcyla) kommt es aufgrund der eingesetzten Konjugationsstrategie zu variierenden Wirkstoff/Antikörper-Verhältnissen (DAR) (vgl. Abschnitt 2.6). Der chemoenzymatische Ansatz mit FGE bietet im Gegensatz dazu die Möglichkeit ADCs mit einer homogenen DAR zu erzeugen.^[13] Um dies zu ermöglichen, müssen sowohl die Biotransformation mit FGE als auch die Konjugationsreaktion mit FGly nahezu quantitative Ausbeuten liefern. Ein unvollständiger Umsatz würde zu Produktgemischen und einer heterogenen DAR führen. Daher müssen Biotransformation und Konjugationschemie optimiert werden, um das gewünschte Produkt zu erhalten.

6.3.1 EGFR als Antigen für FGly-Antikörperfragmente

Der EGF-Rezeptor (EGFR) wird in den meisten Epithel-Tumorzellen überexprimiert und im Vergleich zu gesundem Gewebe ist die Rezeptoranzahl um bis zu Faktor 100 erhöht (vgl. Abschnitt 2.6.2).^{[134][135]} Daher ist der EGFR ein häufig adressiertes Ziel in der Tumor-Therapie. Die im Arbeitskreis von Prof. K. Müller hergestellten Antikörperfragmente scFv-C225-Fc und scFv-425-Fc wurden in Zusammenarbeit mit G. Falck mit einem FGly-*tag* ausgestattet. Die Arbeiten mit den Cystein-Peptiden **68**, **69** und **70** haben gezeigt, dass für Peptid **68** höhere spezifische Aktivitäten erreicht wurden als für die übrigen Peptide (vgl. Abschnitt 6.2.2). Sowohl Δ FGE (58 ± 1.3 mU/mg, MALDI-ToF-MS-Assay) als auch mtbFGE (17.6 ± 0.6 mU/mg, MALDI-ToF-MS-Assay) zeigten im Tris-Puffer bei pH 9.3 eine gute katalytische Aktivität für diese Sequenz. Mit dem **CS1** Peptid wurden höhere spezifische Aktivitäten erreicht, jedoch ist diese Sequenz mit 23 Aminosäuren für einen Protein-*tag* vergleichsweise lang. Insgesamt fiel die Wahl auf die Sequenz LCTPSRAALLTGR (**68**) als Kompromiss zwischen katalytischer Aktivität und Länge der Sequenz. Diese Aminosäuren wurden von G. Falck C-terminal in den Antikörperfragmenten scFv-C225-Fc und scFv-425-Fc platziert (vgl. Abschnitt 2.6.2.) Somit sollten die Antikörperfragmente nach der Biotransformation und Konjugationsreaktion eine DAR von zwei aufweisen.

6.3.2 Biotransformation der Antikörperfragmente mit FGE

Die Reaktionsbedingungen für die Biotransformation mit FGE aus *Homo sapiens* (Δ FGE) und *Mycobacterium tuberculosis* (mtbFGE) wurden in dieser Arbeit bereits für die *in vitro* Synthese aldehydhaltiger Peptide optimiert (vgl. Abschnitt 6.2). Um quantitative Ausbeuten an FGly zu erhalten, können Antikörperfragmente mit diesen Bedingungen *in vitro* oxidiert werden.

Für die *in vitro*-Umsetzung der Antikörperfragmente wurden von G. Falck scFv-C225-Fc und scFv-425-Fc in CHO-Zellen transient exprimiert und über eine Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt. Da das Konstrukt scFv-425-Fc eine bessere Stabilität zeigte und es auch bei höheren Antikörpertitern zu keiner Präzipitation kam, wurde dieses Konstrukt für die initialen Experimente eingesetzt. (persönliche Kommunikation G. Falck) Die Oxidation von scFv-425-Fc mit mtbFGE erfolgte in Anlehnung an die für die Modellpeptide beschriebenen Bedingungen (vgl. Abschnitt 6.2). Die DTT-Konzentration wurde von 3 mM auf 1 mM reduziert, da Vorexperimente zeigten, dass es bei höheren DTT-Konzentrationen zu einer Reduktion der Disulfidbrücken in der *Hinge*-Region kommen kann. Abbildung 6-38 zeigt, dass die katalytische Aktivität von mtbFGE bei DTT-Konzentrationen unter 2 mM stark abnimmt. Daher wurden für die Biotransformation von Antikörperfragmenten deutlich höhere Mengen an mtbFGE eingesetzt.

Bei der Biokonversion mit mtbFGE kam es, wie im Abschnitt 6.2.4 für die Modellpeptide beschrieben, zu einer Präzipitation von mtbFGE nach einer Reaktionszeit von drei bis vier Stunden. Bei diesen ersten Experimenten wurden nur sehr geringe Ausbeuten an Antikörper-Konjugat von 6 % erhalten. Höchstwahrscheinlich kam es zu einer Kopräzipitation von scFv-425-Fc und mtbFGE. Daher wurde die Reaktionszeit für die Biotransformation reduziert und nach einer Stunde eine Reinigung mittels Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 100 kDa) durchgeführt. Durch diese Filtration konnte mtbFGE mit einem Molekulargewicht von 32.7 kDa abgereichert werden und gleichzeitig wurde scFv-425-Fc (111.8 kDa) in den für die Konjugationsreaktion benötigten Puffer mit leicht saurem pH-Wert (pH 6) überführt. Insgesamt konnten so Ausbeuten von bis zu 30 % Antikörper-Konjugat erhalten werden. Die Immobilisierung von mtbFGE könnte die Herstellung der Antikörperfragmente deutlich vereinfachen. Zum einen wäre es möglich eine höhere Enzymstabilität zu erreichen und zum anderen ist das mtbFGE-Immobilisat höchstwahrscheinlich besser vom Produkt zu trennen (vgl. Abschnitt 6.2.5).

Eine Alternative bietet die Koexpression von humanem FGE und Antikörperfragment. Bei der Oxidation der Cystein-Reste *in vivo* ist es ebenfalls entscheidend die optimalen Kultivierungsbedingungen zu wählen, damit hohe Ausbeuten an FGly erreicht werden. In Arbeiten von York *et al.* wurde gezeigt, dass das Medium für die CHO-Zellen, sowie die Kupfer-Konzentration im Medium wichtig sind.^[20] Durch die transiente Koexpression von humanem FGE mit scFv-425-Fc konnte der FGly-tag erfolgreich in das Antikörperfragment eingebaut werden. Jedoch sind die Ausbeuten an Aldehyd noch relativ gering. Die Optimierung der Koexpression unter Einsatz von stabilen Zelllinien ist Gegenstand aktueller Forschung von G. Falck. (persönliche Kommunikation G. Falck)

6.3.3 Konjugationsreaktionen mit den Antikörperfragmenten

Für die Konjugation von Fluorophoren oder Zytostatika mit dem FGly-Rest der Antikörperfragmente könnte eine Oxim-Ligation (Abschnitt 6.1.2), die HIPS-Ligation (Abschnitt 6.1.3), eine Knoevenagel-Reaktion (Abschnitt 6.1.4) oder die Wittig-Reaktion (Abschnitt 6.2.7) verwendet werden. Vorherige Untersuchungen zeigten jedoch, dass sich die Oxim-Ligation aufgrund des Gleichgewichts zwischen Diol und Aldehyd nicht für die Konjugation mit FGly eignet, da geringe Ausbeuten und eine geringe Stabilität des Konjugates erzielt wird (vgl. Abschnitt 6.2.6). Als weiteren Nachteil liegt der optimale pH-Wert für die Oxim-Ligation bei 4.5.^[11]

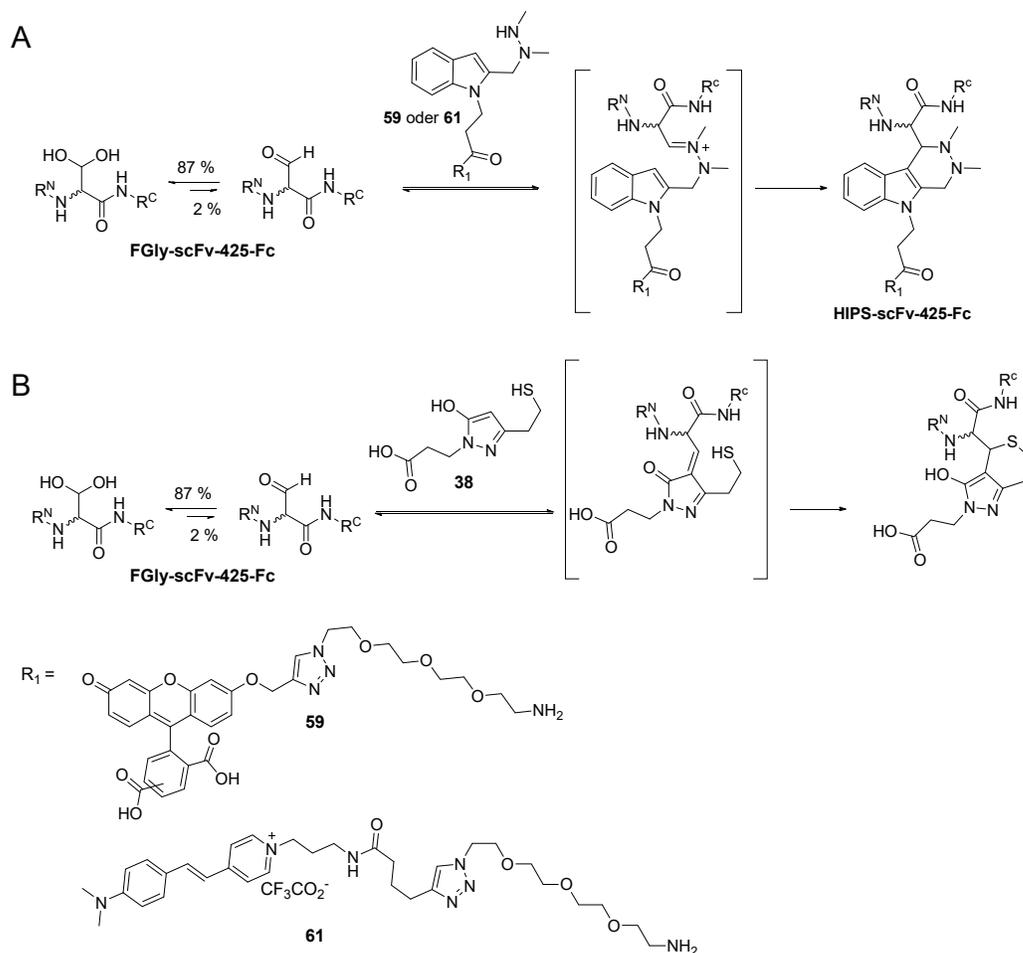


Abbildung 6-63 (A) HIPS- und (B) Knoevenagel-Ligation: (A) Das Dimethylhydrazin-Derivat des Indols reagiert mit FGly-scFv-425-Fc zum Hydrazonium-Intermediat, welches durch den nukleophilen Angriff des Indolringes in Position 3 zum Konjugationsprodukt HIPS-scFv-425-Fc umgesetzt wird. (B) Das Pyrazolon **38** könnte für die Knoevenagel-Ligation mit FGly-scFv-425-Fc eingesetzt werden. Der Baustein **38** reagiert mit FGly zum Intermediat. Dann erfolgt der intramolekulare nukleophile Angriff des Thiois und es wird ein stabiler Sechsering gebildet.

Die Wittig-Reaktion konnte wie in Abschnitt 6.2.7 beschrieben nicht in wässriger Lösung durchgeführt werden. Daher ist die Konjugation zwischen scFv-425-Fc und Effektormolekülen durch eine Wittig-Reaktion nicht möglich. Als alternative bioorthogonale Reaktionen wurden in Arbeiten von D. Rabuka *et al.* die HIPS-Ligation^[12] sowie die Knoevenagel-Ligation^[16] beschrieben. Diese Reaktionen ermöglichen die stabile Konjugation über eine C-C Bindung zwischen FGly und Effektormolekülen.^{[12][16]} Da beide Bausteine in wässriger Lösung stabil sind, können lange Reaktionszeiten eingesetzt werden, um einen vollständigen Umsatz zu erzielen. Trotz des ungünstigen Gleichgewichts zwischen Diol- und Aldehyd-Form von FGly können so gute Ausbeuten an Konjugationsprodukt erreicht werden. Abbildung 6-63 zeigt die HIPS-Ligation und Knoevenagel-Reaktion mit dem FGly-Rest in scFv-425-Fc. Da bei der Synthese der Knoevenagel-Bausteine sehr geringe Ausbeuten für die Kupplung der Peptidbindung zwischen Pyrazolon **38** und PEG-Linker erzielt wurden (vgl. Abschnitt 6.1.7), wurde die HIPS-Ligation für die Produktion der Antikörperkonjugate gewählt. Die Synthese der HIPS-Fluorophor-Bausteine wurde in Abschnitt 5.1.6 beschrieben. In ersten Versuchen wurde das HIPS-Fluorophor **59** mit FGly-scFv-425-Fc in PBS-Puffer pH 6 für drei Stunden bei RT oder für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Bei längeren Inkubationszeiten wurden höhere Konjugationsraten erzielt. Dies lässt sich erneut durch das Gleichgewicht zwischen FGly-Diol und Aldehyd-Form erklären. Daher wurden für die folgenden Experimente lange Reaktionszeiten von 24 h bei 4 °C gewählt. Nach der Konjugation von FGly-scFv-425-Fc mit HIPS-Fluorophor **59** konnte die Präzipitation der Antikörperfragmente beobachtet werden. Möglicherweise kommt es aufgrund des relativ unpolaren Carboxyfluoresceins und des Indolmotivs im HIPS-Fluorophor **59** zur Präzipitation des Konjugates. Die Präzipitation von ADCs ist ein häufig auftretendes Problem und kann durch Modifizierungen des Linkers verhindert werden.^[278] Eine weitere Möglichkeit, die Löslichkeit des Konjugates zu erhöhen könnten Modifizierungen am HIPS-Baustein **24** und **59** sein. Ein Stickstoffatom in Position 7 des Indols würde die Polarität erhöhen.^[25] Weiterhin kann die Anpassung der Pufferbedingungen die Proteinpräzipitation verhindern.^[279] Da die Löslichkeit eines Proteins am isoelektrischen Punkt am geringsten ist, sollte zunächst der pH-Wert des Puffers optimiert werden. Da der pI von scFv-425-Fc bei 7.06 liegt, sollte der pH-Wert der Konjugationsreaktion unproblematisch sein. Auch die Salzkonzentration und Additive wirken sich positiv auf die Löslichkeit aus.^[279] Für die Konjugation von FGly-scFv-425-Fc mit HIPS-Fluorophor **59** wurden die folgenden Pufferbedingungen evaluiert (Tabelle 6-9):

Tabelle 6-9 Pufferbedingungen für die Konjugation von FGly-scFv-425-Fc mit HIPS-Fluorophor **59**:

#	Puffer	Additive
1	PBS, pH 6	-
2	HEPES, pH 6	-
3	HEPES, pH 6	0.2 M Sorbitol ^{[280][281]}
4	PBS, pH 6	0.2 M Arginin ^[282]
5	PBS, pH 6	0.085 % DME, 0.085% Triton X ^[16]
6	PBS, pH 6	0.085 % DME, 0.2 M Arginin

Es wurden HEPES- oder PBS-Puffer gewählt, da nach der Konjugation mit dem HIPS-Fluorophor **59** *live cell imaging* Experimente geplant waren. Beide Puffer eignen sich für diese Experimente, wobei HEPES-Puffer in Gegenwart von CO₂ das stabilere Puffersystem bietet.^[283] Insgesamt kam es bei allen getesteten Bedingungen zu einer Präzipitation des Konjugates. Mit der Bedingung Nr. 4 wurden die besten Ergebnisse erzielt und es konnten nach der Reinigung Ausbeuten von bis zu 30 % des Antikörper-Konjugates erhalten werden. Nach der Konjugationsreaktion wurde der pH-Wert mittels Zentrifugalkonzentratoren auf 7.4 eingestellt und die Konjugate wurden durch Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt.

6.3.4 Reinigung der scFv-425-Fc Fluorophorkonjugate

Nach der Biotransformation *in vitro* mit mtbFGE und der HIPS-Ligation mit **59** wurde eine SEC durchgeführt, um den Überschuss an Fluorophor **59** abzutrennen. In Abbildung 6-64 wird exemplarisch die Effektivität der Reinigung mittels SEC aufgezeigt. Mit der Säule Superdex 75 10/300 GL, welche für die Trennung von Proteinen zwischen 3 kDa und 70 kDa ausgelegt ist, konnten erfolgreich alle Verunreinigungen vom HIPS-scFv-425-Fc Konjugat abgetrennt werden.

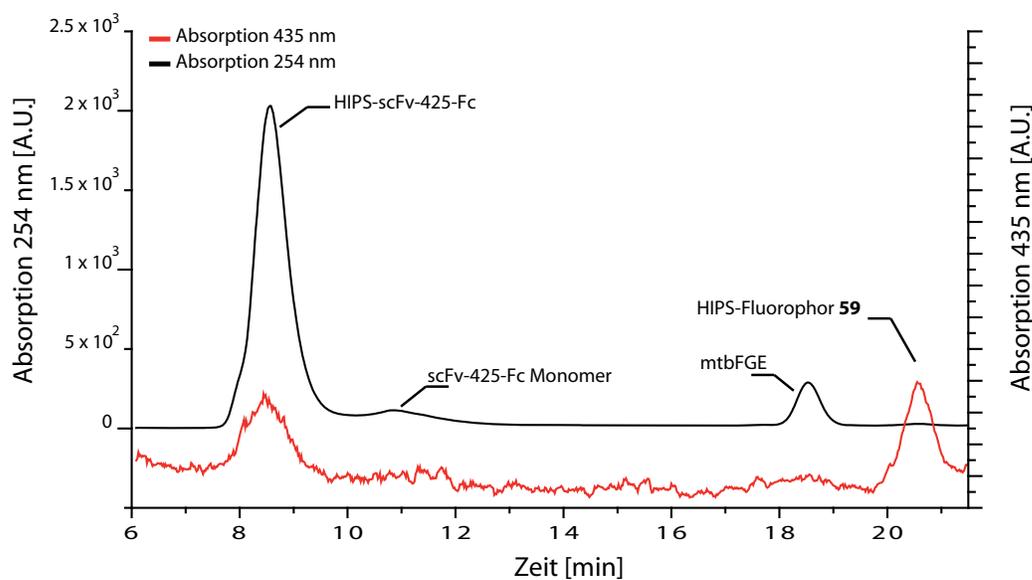


Abbildung 6-64 SEC der HIPS-scFv-425-Fc Konjugat: Für die Reinigung wurde die Säule Superdex 75 10/300 GL eingesetzt (Schwarz: Absorption bei 254 nm, Rot: Absorption bei 500 nm). Die Elution erfolgte isokratisch mit PBS, pH 7.4, 0.2 M Arg. Bei 8 bis 10 mL ist ein scharfes Signal zu erkennen, welches dem HIPS-scFv-425-Fc Konjugat zugeordnet werden konnte.

Bei dem Signal mit einer Retentionszeit von elf Minuten könnte es sich um das scFv-425-Fc Monomer handeln. Während der Biotransformation *in vitro* wurde 1 mM DTT eingesetzt, wodurch es zu einer Reduktion der Disulfidbrücken in der *Hinge*-Region gekommen sein könnte. Die Intensität des Signals ist jedoch sehr gering. Bei 18.5 Minuten wurde restliches mtbFGE aus der Biotransformation detektiert, welches mittels

Zentrifugalkonzentratoren nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Der Überschuss an Fluorophor **59** eluiert am Ausschlussvolumen der Säule bei 21 Minuten. Dieses Signal ist nur bei 435 nm zu erkennen, da das Absorptionsmaximum von **59** bei 435 nm liegt (vgl. Abschnitt 5.1.6). Insgesamt ist die Signalintensität bei 435 nm sehr gering, da der Detektor der Chromatographie-Anlage bei höheren Wellenlängen eine geringe Sensitivität besitzt. Die Reinigung der HIPS-scFv-425-Fc Konjugate, welche durch Koexpression mit humanem FGE und anschließender HIPS-Ligation mit **59** hergestellt wurden, konnten erfolgreich durch eine HiTrap *Desalting* G-25 Säule gereinigt werden, da kein scFv-425-Fc Monomer oder restliches FGE im Rohprodukt vorhanden ist.

6.3.5 Vergleich der Biotransformation *in vitro* oder *in vivo*

Die Oxidation von Cystein zu FGly für die Herstellung von FGly-Antikörperfragmenten kann *in vitro* durch mtbFGE oder *in vivo* durch Koexpression mit humanem FGE durchgeführt werden (vgl. Abbildung 6-65) Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Biotransformation mit FGE besitzen verschiedene Vor- und Nachteile. Bei der Expression von scFv-425-Fc mit anschließender *in vitro* Oxidation von Cystein durch mtbFGE wurden höhere Antikörpertiter erzielt als in Koexpression. (persönliche Kommunikation G. Falck) Zusätzlich können hohe Mengen mtbFGE (50 Mol-%) verwendet werden, um einen vollständigen Umsatz von Cystein zu FGly zu garantieren. Der Vorteil der *in vivo* Biotransformation liegt darin, dass die Durchführung deutlich einfacher ist. Das mtbFGE musste nicht durch Zentrifugalkonzentratoren abgereichert werden. Die FGly-Antikörperfragmente konnten direkt aus den Zellkulturüberständen gereinigt werden. Da der optimale pH-Wert für die HIPS-Ligation bei 6 liegt und im Gegensatz dazu der pH-Wert für die Biotransformation mit FGE bei 9.3 liegt ist ein Umpuffern der Antikörperfragmente nach *in vitro* Oxidation nötig. Bei Reinigung der FGly-Antikörperfragmente aus Koexpression erfolgte die Elution von der Protein A-Säule im sauren, womit kein Umpuffern nötig ist.

Die Optimierung der Koexpression unter Einsatz von stabilen Zelllinien ist Gegenstand aktueller Forschung von G. Falck. (persönliche Kommunikation G. Falck) Sobald mit dieser Technik gute Antikörpertiter mit einem hohen Anteil an FGly erreicht werden, ist diese Strategie im Vergleich zu der *in vitro* Konversion zu bevorzugen.

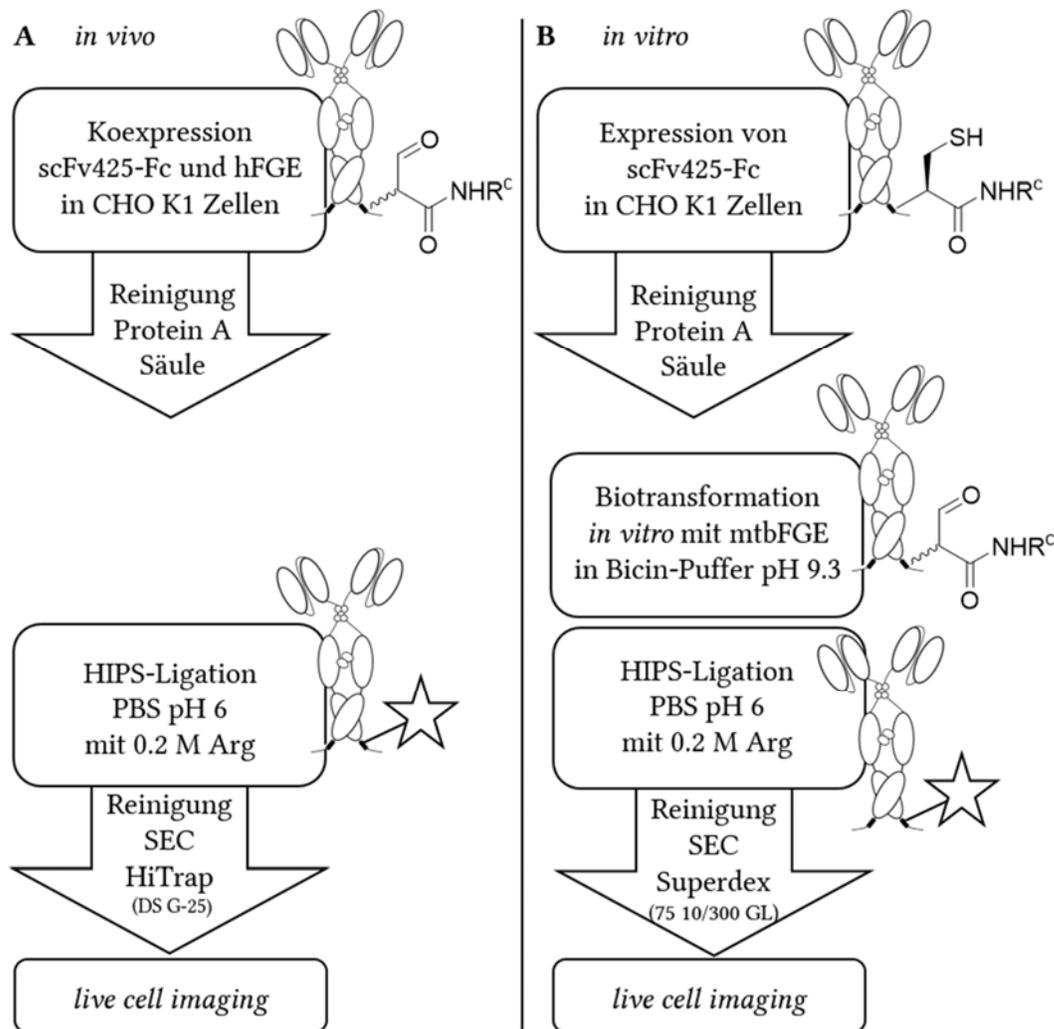


Abbildung 6-65 Prozessführung für die Herstellung der HIPS-scFv-425-Fc Konjugate: Die Expression von scFv-425-Fc erfolgt in CHO K1-Zellen. Optional ist die Koexpression von hFGE möglich. Nach der Reinigung durch eine Protein A-Säule wurden so die Cys-scFv-425-Fc oder FGly-scFv-425-Fc Antikörperfragmente erhalten. (G. Falck) Nach der Biotransformation und HIPS-Ligation wurde eine abschließende Reinigung durch SEC durchgeführt.

6.3.6 Evaluation der HIPS-scFv-425-Fc Konjugate

Der monoklonale, humanisierte Antikörper Matuzumab zeigt eine hohe Affinität zur Domäne III von EGFR (vgl. Abschnitt 2.6.2). Jedoch wurden die klinischen Studien in Phase II aufgrund negativer Ergebnisse abgebrochen.^[284] Das Antikörperfragment scFv-425-Fc basiert auf dem murinen Vorläufer von Matuzumab.^[138] Allerdings könnte die Kombination mit einem Zytostatikum zu einem potenten ADC führen. Für ADCs ist die Internalisierung des Konjugates nach Bindung des Antigens wichtig, damit das Zytostatikum sein Ziel erreicht.^[285] Der EGFR besitzt eine Halbwertszeit von 24 h in der Plasmamembran.^[286] In Arbeiten von L. Henriksen *et al.* wurde gezeigt, dass der EGFR

nach der Bindung von Wachstumsfaktoren hauptsächlich durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wird. Weiterhin wird die Existenz eines weiteren Mechanismus vermutet, welcher Clathrin-unabhängig stattfindet.^[287] Da das Antikörperfragment scFv-425-Fc jedoch außerhalb der EGF-Bindestelle die Domäne III bindet,^[137] wäre es möglich, dass keine Clathrin-vermittelte Endozytose ausgelöst wird.

Es wurden *live cell imaging* Experimente mit HIPS-scFv-425-Fc durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Konjugat internalisiert wird. Um zu demonstrieren, dass die Bindung an die Zellen sowie die Internalisierung EGFR-abhängig ist, wurden verschiedene Zelllinien eingesetzt. So zeigen die Zelllinien A431, HeLa und MCF7 deutlich unterschiedliche Expressionslevel an EGFR, wodurch es möglich ist Selektivitätsprofile zu erhalten.

Durch die Färbung der Zellmembran mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff CELLMASK *deep red* konnte die Kolokalisation mit EGFR auf der Zellmembran ermittelt werden.^[288] Durch die Färbung der Lysosomen mit LYSOTRACKER *blue*^[289] wurde untersucht, ob das HIPS-scFv-425-Fc Konjugat internalisiert wird. Dieser Fluoreszenzfarbstoff reichert sich in sauren Kompartimenten der Zelle an. Somit werden auch das frühe und späte Endosom (EE, LE) und die Peroxisomen im blauen Wellenlängenbereich zu detektieren. Abbildung 6-66 zeigt das Anregungs-Emissionsspektrum dieser Farbstoffe. Durch die Wahl dieser Fluorophore kann bei den verwendeten Lasern für die Anregung und den eingesetzten Emissionsfiltern ausgeschlossen werden, dass es zu Kreuzsignalen kommt.

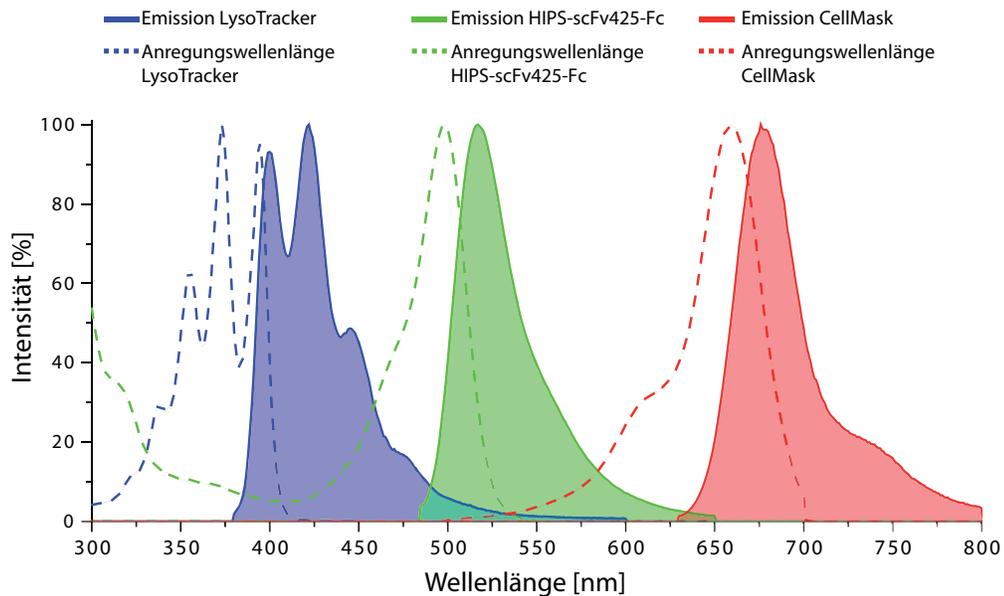


Abbildung 6-66 Anregungs-Emissionsspektrum der eingesetzten Farbstoffe: (Blau) LYSOTRACKER (Laser 405 nm, 5 mW), (Grün) HIPS-scFv-425-Fc (Laser 488 nm, 5 mW), (Rot) CELLMASK (Laser 639 nm, 5 mW).

Bei der Bewertung der Signalintensität im grünen Kanal (HIPS-scFv-425-Fc) muss in Betracht gezogen werden, dass das konjugierte Fluorophor **59** auf 5,-6-

Carboxyfluorescein basiert, welches eine geringe Photostabilität besitzt.^[290] Weiterhin lactonisiert Carboxyfluorescein im Sauren ab einem pH-Wert von 4 (vgl. Abbildung 6-67).^[200] Da der pH-Wert in den Lysosomen bei 4.5-5^[201] liegt, kann davon ausgegangen werden, dass anteilig das Carboxyfluorescein-Lacton vorliegt. Somit ist es möglich, dass die reale Abundanz von HIPS-scFv-425-Fc in den Lysosomen und bei den Aufnahmen nach 30 Minuten höher ist, als es die Signalintensität schließen lässt.

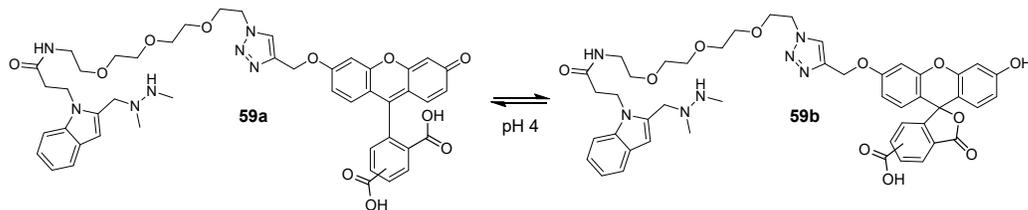


Abbildung 6-67 Tautomerie des Fluorophors **59**: Ab einem pH-Wert von 4 lactonisiert **59a**, das nicht-fluoreszente Tautomer **59b** wird gebildet.^[200]

Die Fluoreszenzbilder sind auf den folgenden Seiten dargestellt und die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mittels Fiji.^[291]

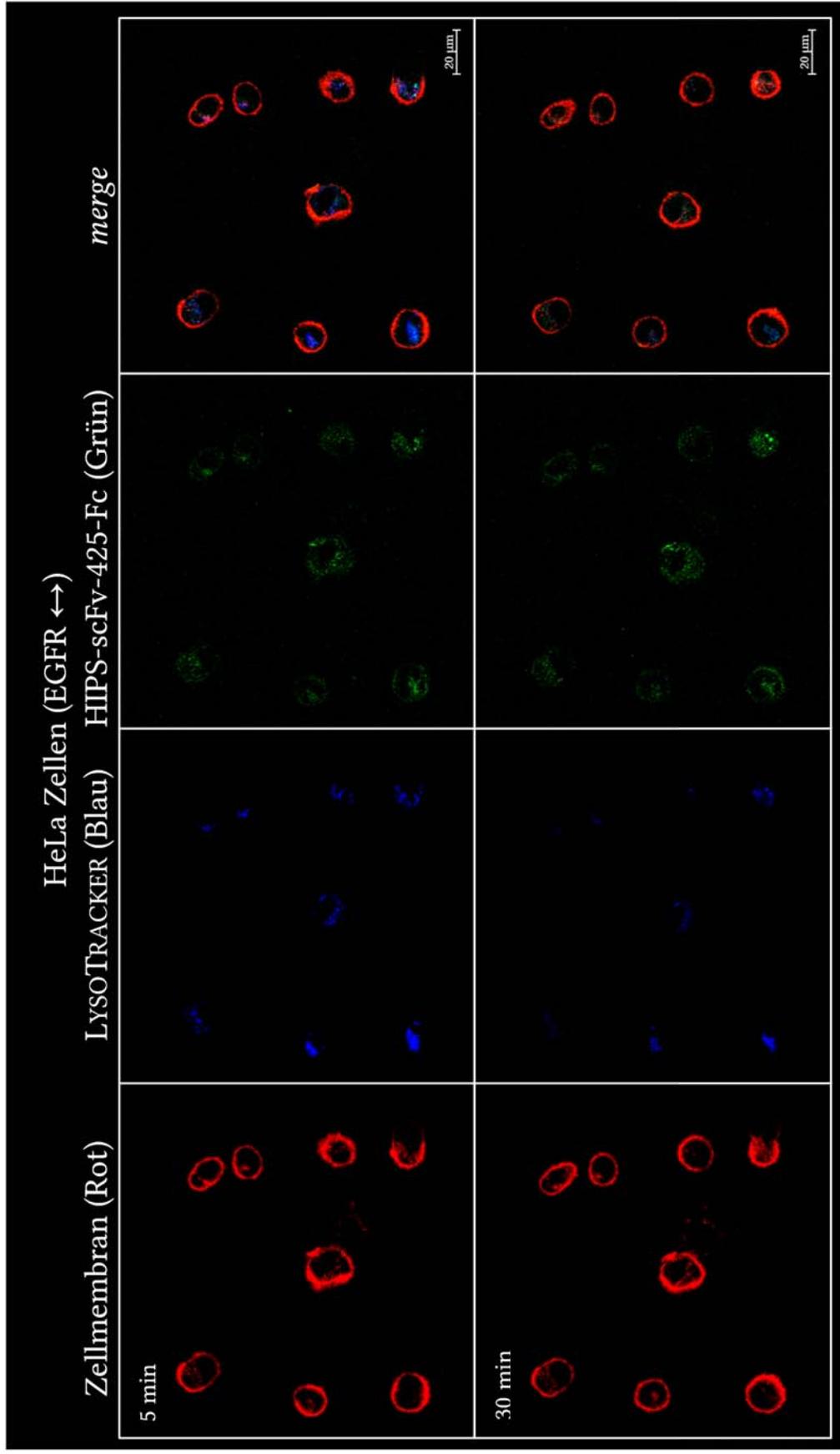


Abbildung 6-68 *live cell imaging* mit HeLa Zellen: Die adhären wachsenden Zellen wurden für 30 Minuten mit LYSOTracker (75 nM, 37 °C) in DMEM-Medium inkubiert. Dann wurde CELLMASK *deep red* hinzugefügt. Nach 10 Minuten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und am CLSM mikroskopiert.

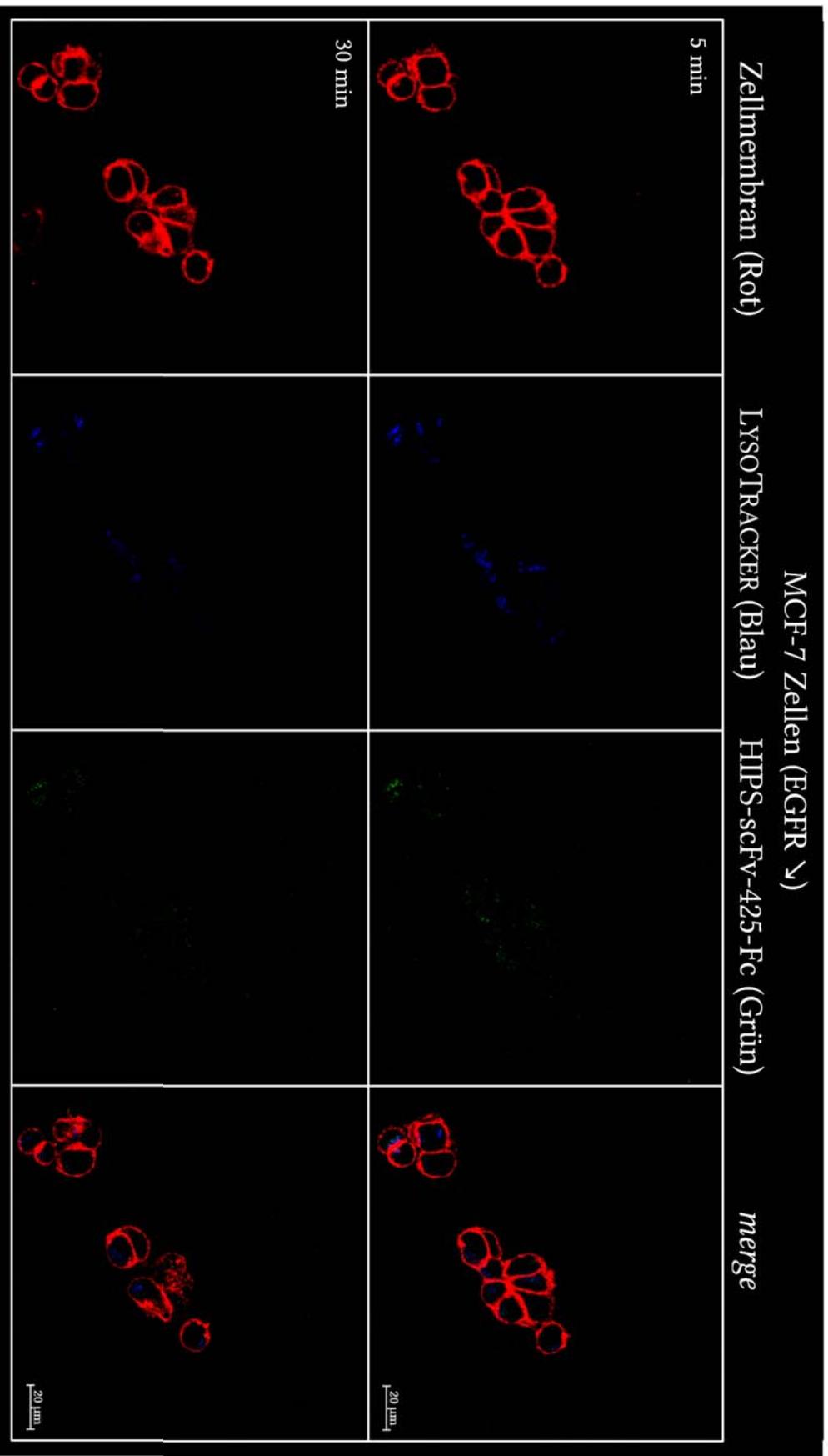


Abbildung 6-69 *live cell imaging* mit MCF-7 Zellen: Die adhärenent wachsenden Zellen wurden für 30 Minuten mit LYSOTRACKER (75 nM, 37 °C) in DMEM-Medium inkubiert. Dann wurde CELLMASK *deep red* hinzugefügt. Nach 10 Minuten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und am CLSM mikroskopiert.

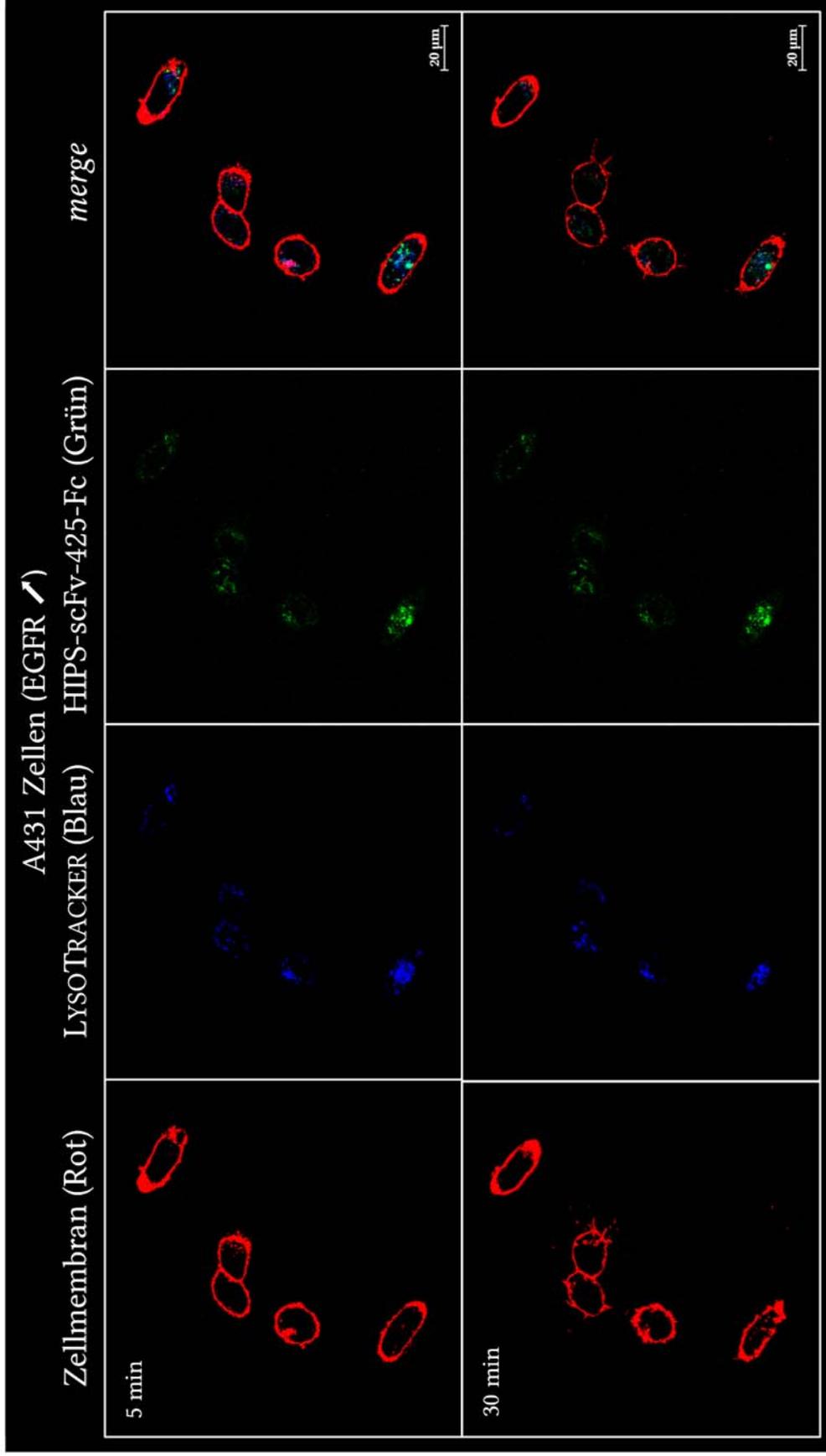


Abbildung 6-70 *live cell imaging* mit A431 Zellen: Die adhärent wachsenden Zellen wurden für 30 Minuten mit LYSOTracker (75 nM, 37 °C) in DMEM-Medium inkubiert. Dann wurde CELLMASK *deep red* hinzugefügt. Nach 10 Minuten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und am CLSM mikroskopiert.

Bei den Experimenten mit der HeLa-Zelllinie, welche eine mittlere EGFR-Expression zeigt (ca. 1×10^5 Rezeptoren pro Zelle), waren im grünen Kanal (HIPS-scFv-425-Fc) deutliche Signale zu erkennen. Die über die Fläche der Zellen integrierte Signalintensität betrug 3018 A.U. (n=5). Der Vergleich der Aufnahme nach 5 Minuten mit den Bildern nach 30 Minuten zeigte, dass die Signalintensität leicht zunimmt. Die Überlagerung mit dem roten Kanal (Zellmembran) und dem blauen Kanal (Lysosomen, EE, LE) verdeutlicht, dass das Konjugat auf der Zelloberfläche (53 %, n=5) und in den Lysosomen/Endosomen (47%, n=5) lokalisiert ist. Im Vergleich hierzu war die Signalintensität für HIPS-scFV-425-Fc bei der MCF7-Zelllinie sowohl auf der Zelloberfläche (57 %, n=5) als auch in den Lysosomen/Endosomen (43 %, n=5) sehr gering mit einer Signalintensität von 665 A.U. (n=5). MCF7-Zellen zeigen eine sehr geringe EGFR-Expression. Somit entsprechen die Signalintensitäten den Erwartungen. Die Zelllinie A431 verfügt mit ca. 2×10^6 Rezeptoren pro Zelle über die höchste EGFR-Expression. Bei den Fluoreszenzaufnahmen war deutlich zu erkennen, dass das HIPS-scFV-425-Fc Konjugat vorwiegend in den Lysosomen/Endosomen (63 %, n=5) lokalisiert war. Die Signalintensität im grünen Kanal lag bei 4462 A.U. (n=5). Der Vergleich mit dem blauen Kanal (Lysosomen, EE, LE) zeigte eine deutliche Kollokalisierung. Insgesamt deuten die Fluoreszenzbilder darauf hin, dass das HIPS-scFV-425-Fc Konjugat erfolgreich EGFR bindet und anschließend durch Rezeptor vermittelte Endocytose internalisiert wird. Die Fluoreszenzbilder zeigen, dass bereits nach fünf Minuten Inkubationszeit mit HIPS-scFv-425-Fc eine Kollokalisierung mit dem blauen Kanal (Lysosomen, EE, LE) vorliegt. Diese Zeitspanne entspricht den Erwartungen für die Clathrin-vermittelte Endocytose. Nach Stimulation des EGFR mit EGF konnte der Rezeptor nach zwei bis fünf Minuten im EE detektiert werden.^[292] Daraufhin kann der EGFR durch *sorting endosomes* das Lysosom innerhalb von 20 bis 60 Minuten erreichen^[293] oder durch *retroendocytosis* innerhalb von fünf Minuten zurück zur Zellmembran transportiert werden.^[293]

Weiterhin präsentieren die Bilder ein klares Selektivitätsprofil. Die Zelllinie MCF7 mit sehr geringer EGFR-Expression zeigte die geringste Signalintensität im grünen Kanal an der Zellmembran und in den Lysosomen. Von den HeLa-Zellen bis hin zu den A431-Zellen mit der höchsten Antigen-Expression nehmen die Signalintensitäten zu.

Um auszuschließen, dass bei der Internalisierung ein passiver Membrantransport beteiligt ist, sind Experimente bei tieferen Temperaturen nötig. In der Kälte verlangsamt sich der Stoffwechsel und aktive Prozesse wie Clathrin-vermittelte Endocytose finden kaum statt.^[294] Aufgrund apparativer Beschränkungen konnten bisher keine erfolgreichen *live cell imaging* Experimente bei 4 °C durchgeführt werden. Aufgrund von Temperaturschwankungen kam es bei den Aufnahmen zu einem sehr starken thermisch bedingten Fokusdrift. Für weitere Arbeiten sollten daher Experimente mit fixierten Zellen durchgeführt werden.

Insgesamt wurde in diesem Abschnitt beschrieben, dass die Biotransformation eines Cystein-Restes zu FGly innerhalb des Antikörperfragmentes scFv-425-Fc möglich ist. Für diese Experimente wurde mtbFGE eingesetzt. Unter Einsatz der HIPS-Ligation konnte ein Fluorophor-Konjugat hergestellt werden und die finale Evaluierung von HIPS-scFv-425-Fc durch *live cell imaging* zeigte, dass das Konjugat den EGFR bindet und daraufhin internalisiert wurde. Mit den Zelllinien A431, HeLa und MCF7 wurde ein

klarer Zusammenhang der Internalisierung mit dem Expressionslevel von EGFR gezeigt (vgl. Abbildung 6-71).

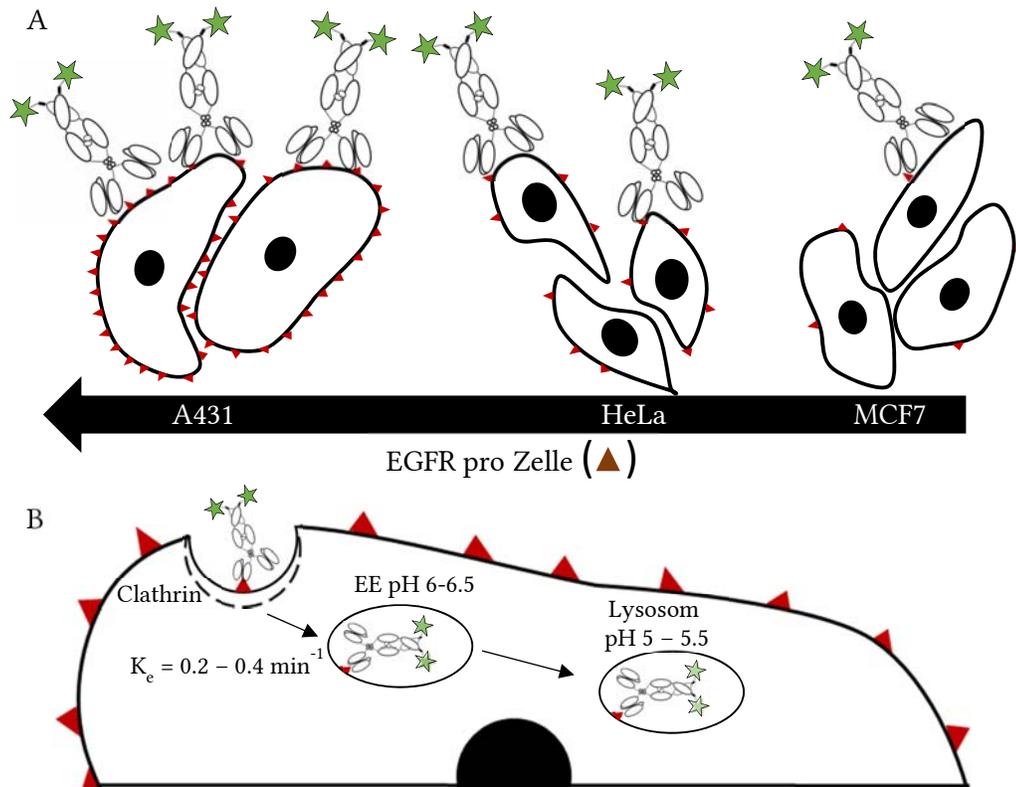


Abbildung 6-71 Schema für die Bindung und Internalisierung von HIPS-scFv-425-Fc: (A) Bei den Experimenten mit HIPS-scFv-425-Fc wurde ein Selektivitätsprofil beobachtet. Die Zelllinie MCF7 mit sehr geringer EGFR Expression zeigte die geringste Signalintensität für HIPS-scFv-425-Fc. Von den HeLa-Zellen bis hin zu den A431-Zellen mit der höchsten Antigen-Expression nehmen die Signalintensitäten zu. (B) Postulierter Mechanismus der Internalisierung von HIPS-scFv-425-Fc. Durch Clathrin vermittelte Endozytose gelangt das Antikörperfragment in die frühen Endosomen (EE) und später in das Lysosom.^{[293][140]}

7. Ausblick

C^α-Formylglycin-generierende Enzyme als Biokatalysatoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die C^α-Formylglycin-generierenden Enzyme (FGE) aus *Mycobacterium tuberculosis* (AS 2-299, mtbFGE) und *homo sapiens* (AS 73-374, ΔFGE) exprimiert und gereinigt. Hierbei lag der Fokus auf dem Einsatz dieser Enzyme als Biokatalysatoren für die Peptidchemie oder Proteinkonjugation. Im Laufe der Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass die Enzymstabilität der Kapazitätsengpass der Biotransformation ist. Aufgrund von Enzympräzipitation nach zwei Stunden Reaktionszeit wurde eine geringe *turnover number* (TON, *P*) erzielt, daher ist es nötig mtbFGE und ΔFGE zu stabilisieren. Die beschriebenen initialen Experimente zur Immobilisierung von mtbFGE deuten darauf hin, dass durch die Konjugation mit einem Trägermaterial höhere Stabilitäten erreicht werden können, jedoch ergaben die Versuche mit einem Epoxid-Harz oder *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs), dass sich die Lysin-Reste im Enzym nicht für eine Immobilisierung eignen. Daher wurde die Variante mtbFGE-L(FGly)TPSR hergestellt, um die Enzymimmobilisierung über den Aldehyd-*tag* zu realisieren. Hierbei wurden mit dem Knoevenagel-Baustein **38** geringe Ausbeuten erzielt (vgl. Abschnitt 5.1.4), daher empfiehlt sich für zukünftige Experimente die Verwendung des HIPS-Bausteins **24**. Nach der Konjugation von PEG-Linkern, wie z. B. **4**, könnte die freie Säure in einen Aktivester analog zu **57** überführt werden. Abschließend würde dieser Baustein eingesetzt, um das Resindion Harz HA403 oder MCF-Schäume zu derivatisieren. Unter Verwendung der in dieser Arbeit erzeugten mtbFGE-L(FGly)TPSR-Variante sollte die einstufige Reinigung und Immobilisierung von mtbFGE möglich sein.

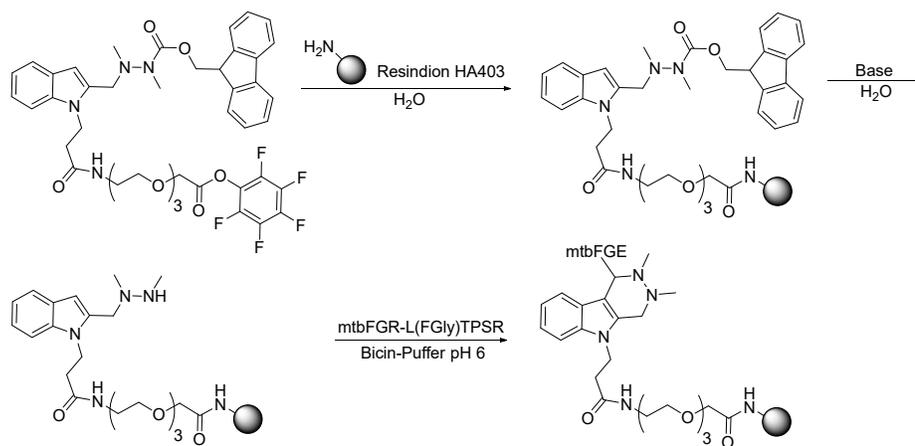


Abbildung 7-1 Immobilisierung von mtbFGE über den Aldehyd-*tag*: Die HIPS-Ligation ist eine mögliche Strategie, um mtbFGE-L(FGly)TPSR an einem Trägermaterial zu immobilisieren.

C^α-Formylglycin in der Peptidsynthese

Die spektroskopische Charakterisierung der Aldehyd-Peptide **71** und **73** ergab, dass die Keto-Enol-Tautomerie zu einer Racemisierung von C^α-Formylglycin (FGly) führt. Daher eignet sich die chemoenzymatische Derivatisierung von Peptiden mittels FGE mit folgenden Wittig-Reaktionen nicht für die Synthese von Peptiden mit neuen funktionellen Gruppen. Für biologische Anwendungen und Struktur-Wirkungsbeziehungen ist eine definierte Stereochemie am C^α entscheidend. Daher sollten in zukünftigen Arbeiten Folgereaktionen durchgeführt werden, welche durch eine Alkylierung den CH-aciden Wasserstoff ersetzen. Wenn FGly als Enolatkomponente fungiert, wäre es möglich, unter Prolinkatalyse das Enamin-Intermediat zu alkylieren.^[278] In diesem Kontext wäre zu klären, inwiefern die Peptidumgebung und Prolin zu Stereoinduktion führen. Weiterhin könnte das Problem der Racemisierung umgangen werden, indem ein sp²-hybridisiertes C^α-Kohlenstoffatom erzeugt wird. Dies könnte über Cyclisierungsreaktionen, welche die vorausgehende oder nachfolgende Amidfunktion einbeziehen, erreicht werden. FGly könnte somit eingesetzt werden, um Peptide nachträglich in Heterocyclen umzuwandeln. In Arbeiten von S. Wales^[295] und J. Che^[296] wird die Bildung von Oxazolen innerhalb der Peptidsequenz beschrieben (vgl. Abbildung 7-2).

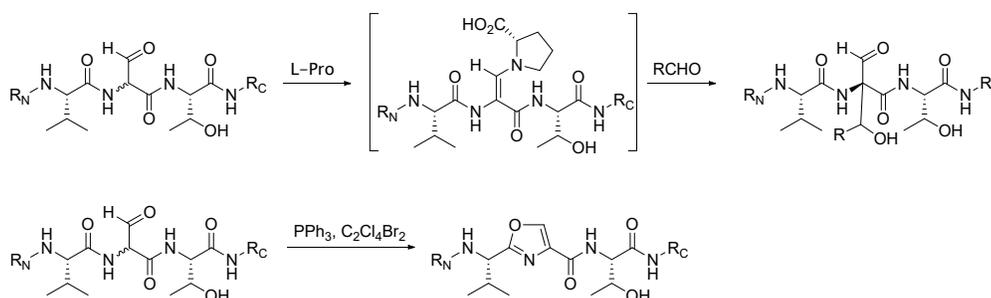


Abbildung 7-2 Mögliche Derivatisierungen von FGly: Durch Prolinkatalyse könnte das Enamin-Intermediat alkyliert werden. Weiterhin könnte unter Verwendung von 1,2-Dibromotetrachloroethan und Triphenylphosphan oder Deoxo-Fluor in der Peptidsequenz ein Oxazol generiert werden.

Derivatisierung von Antikörperfragmenten

In dieser Arbeit wurde in einem chemoenzymatischen Ansatz das Antikörperfragment scFV-425-Fc durch FGE mit dem Aldehyd-tag funktionalisiert, woraufhin durch die HIPS-Ligation ein Fluorophor konjugiert werden konnte. Für zukünftige Anwendungen könnte es von Interesse sein, Proteine mit zwei verschiedenen Effektormolekülen auszustatten. Durch die Konjugation eines Zytostatikums und Polyethylenglycol würde die Löslichkeit der Konjugate verbessert werden oder durch die Kupplung von zwei verschiedenen Zytostatika würde eine Kombinations-Chemotherapie analog zu der CHOP-^[297] oder VAD-Therapie^[298] ermöglicht werden. Hierfür könnten FGE und AtsB eingesetzt werden, welche Cystein oder Serin in verschiedenen Erkennungssequenzen zu FGly umsetzen. In ersten Experimenten wurde das Radikal-SAM-Protein AtsB aus *Methanosarcina mazei* nach dem Protokoll von S. Weiland gereinigt.^[96] Weiterhin wurde die Synthese von Modellpeptiden begonnen und der DARPin E01^[299] als Modellprotein gereinigt. Diese Experimente wurden während der Masterarbeit von T. Krüger weitergeführt.^[212] Abbildung 7-3 zeigt eine mögliche Reaktionssequenz für die zweifache Derivatisierung von Antikörperfragmenten durch FGE und AtsB.

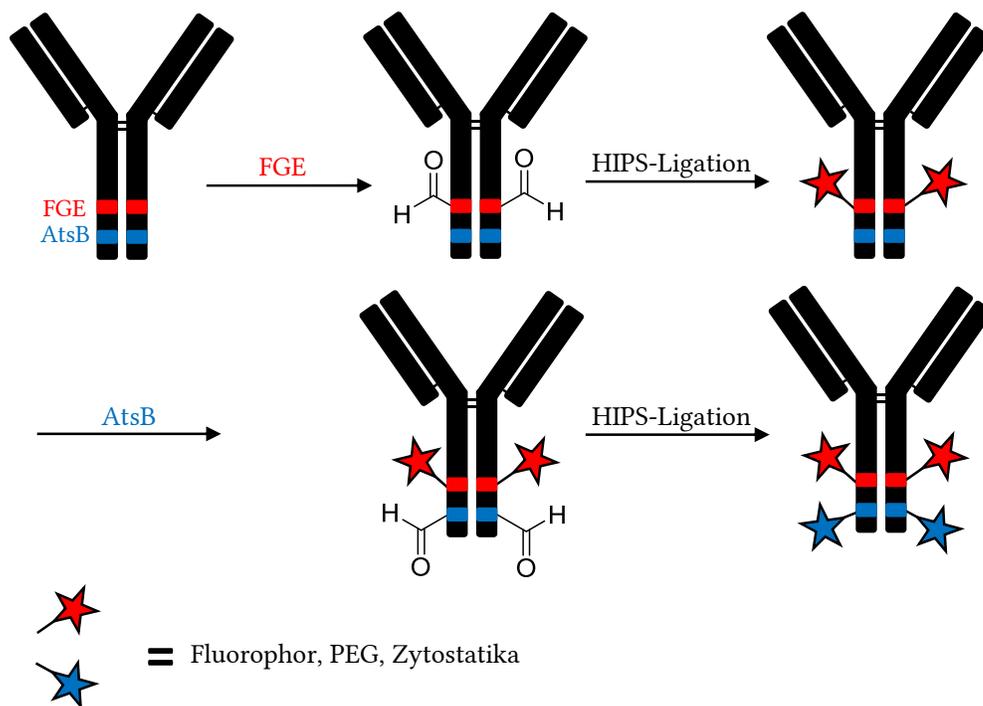


Abbildung 7-3 Bioorthogonale Derivatisierung von Antikörperfragmenten durch FGE und AtsB: Durch die Biotransformation könnte die erste Erkennungssequenz mit FGE zum Aldehyd oxidiert werden und durch die HIPS-Ligation wäre eine Konjugation mit verschiedenen Effektormolekülen möglich. Die zweite Erkennungssequenz wird durch AtsB umgesetzt und infolgedessen könnte die HIPS-Ligation mit einem anderen Effektormolekül durchgeführt werden.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
A	Ampere
A	Absorption
Å	Angström
abs.	absolut (wasserfrei)
ACN	Acetonitril
ADC	<i>antibody drug conjugate</i> (Antikörper-Wirkstoff-Konjugat)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalent
Ar	Aryl
AS	Aminosäure
ASA	Arylsulfatase A
AtsA	Arylsulfatase aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>
AtsB	FGE aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
Bz	Benzyl
CCD	<i>charge coupled device</i>
cDNA	<i>coding</i> DNA
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i> (Ovar-Zellen chinesischer Hamster)
CuAAC	Kupfer-katalysierte [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition
CV	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)
d	Dublett
Da	Dalton
DAR	<i>drug to antibody ratio</i> (Antikörper/Toxin-Verhältnis)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat

Abkürzung	Bedeutung
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> (doppelsträngige DNA)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EE	<i>early endosome</i> (frühes Endosom)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOAc	Ethylacetat
<i>et al.</i>	und andere
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Fab	Antikörperfragment nach Papain-verdau
Fc	Antikörperfragment nach Papain-verdau
FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
FGly	Formylglycin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
GSH	reduziertes Glutathion
GSSH	oxidiertes Glutathion
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
hGH	<i>human growth hormon</i>
HIPS	Hydrazino- <i>iso</i> -Pictet-Spengler
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HR	<i>high resolution</i> (hochaufgelöst)
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
IAM	Iodacetamid
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IgG	Immunglobulin Klasse G
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
J	Kopplungskonstante
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertani

Abkürzung	Bedeutung
M	Molekülion, molare Masse, molar,
MALDI ToF MS	<i>matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MBP	Maltose-bindendes Protein
MeOH	Methanol
min	Minute
MM	<i>Methanosarcina mazei</i>
mol	Stoffmenge
MSD	Multiple Sulfatase Defizienz
mtbFGE	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> FGE
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NHS	NHydroxysuccinimid
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernresonanz)
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatsalzpuffer)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDI	Proteindisulfidisomerase
PE	Petrolether
PG	<i>protecting group</i> (Schutzgruppe)
Ph	Phenyl
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
PPM	posttranslationale Proteinmodifikation
q	Quartett
ROESY	rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy
RP	reversed phase (Umkehrphase)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde, Singulett
sc	<i>single chain</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
scFGE	<i>Streptomyces coelicolor</i> FGE
SA	Sinapinsäure
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> (einzelsträngige DNA)
SUMF	<i>Sulfatase-modifying factor</i>
t	Triplet
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

Abkürzung	Bedeutung
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TE	Transesterifizierungsmechanismus
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
t _R	Retentionszeit
tRNA	Transfer-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
U	Unit, Enzymeinheit 1U = 1 µmol/min
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
V _H	variable schwere Kette
V _L	variable leichte Kette
w/v	Masse pro Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
z. B.	zum Beispiel
β-ME	β-Mercaptoethanol
ΔFGE	N-terminal trunke Form von FGE, in der AS-Reste 34-72 fehlen
δ	chemische Verschiebung
ε	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
μ	Mikro

Aminosäure	Abkürzung	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T

Aminosäure	Abkürzung	Einbuchstaben-Code
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Nucleosid	Einbuchstaben-Code
Adenosin	A
Cytidin	C
Guanosin	G
Thymidin	T
Uridin	U

8.2 NMR-Daten von Peptid 71

Tabelle 8-1: ¹H-NMR-Zuordnung von Ac-YL(FGly)TPSR-NH₂ in H₂O/D₂O 90/10, pH 5, 300 K

	δ ppm						
	H ^N	H ^α	H ^β	H ^γ	H ^δ	H ^ε	H ^ζ
Ac	8.43 m	1.95 s	-	-	-	-	-
Tyr¹	8.11 m	4.50 m	2.90 m 3.00 m	-	7.12 m	7.07 m	-
Leu²	8.21 m	4.43 m	1.60 m	1.52 m	0.89 m 0.84 m	-	-
Diol³	8.18 m	4.40 m	5.29 m	-	-	-	-
FGly³	n. d.	n. d.	9.56 m	-	-	-	-
Thr⁴	8.26 m	4.65 m	4.17 m	-	-	-	-
Pro⁵	-	3.82 m	2.31 m 2.21 m	2.01 m	3.72 m	-	-
Ser⁶	8.40 m	4.42 m	3.81 m	-	-	-	-
Arg⁷	8.38 m	4.34 m	1.90 m 1.74 m	1.64 m	3.20 m	-	-

8.3 Proteinsequenzen

Mycobacterium tuberculosis FGE (AS 2-299, mtbFGE)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHLTELVDLPGGSRMGSTRFYPEEAPIHTVTVRAFAVERHPVTNAQF
 AEFVSATGYVTVAEQPLDGLYPGVDAADLCPGAMVFCPTAGPVDLDRDWRQWWDWVPGACWRHP
 FGRSDIADRAGHPVVQVAYPDAVAYARWAGRRLPTEAEWEYAARGGTTATYAWGDQEKPGGML
 MANTWQGRFPYRNDGALGWVGTSPVGRFPANGFGLDMIGNVWEWTTTEFYPHHRIDPPSTACC
 APVKLATAADPTISQTLKGGSHLCAPEYCHRYRPAARSPQSQDTATTHIGFRCVADPVSG

Mycobacterium tuberculosis FGE (mtbFGE-LCTPSR)

MGSSHHHHHHSSGLCTPSRVPRGSHMLTELVDLPGGSFRMGSTRFYPEEAPIHTVTVRAFAVERHP
VTNAQFAEFVSATGYVTVAEQPLDPGLYPGVDAADLCPGAMVFCPTAGPVDLRDWRQWWDWVPG
ACWRHPFGRSDIADRAGHPVVQVAYPDAVAYARWAGRRLPTEAEWEYAARGGTTATYAWGDQE
KPGGMLMANTWQGRFPYRNDGALGWVGTSPVGRFPANGFGLLDMIGNVWEWTTTEFYPHHRIDP
PSTACCAPVKLATAADPTISQTLKGGSHLCAPEYCHRYRPAARSPQSQDTATTHIGFRCVADPV
SG

Homo sapiens FGE (AS 73-374, ΔFGE)

ADLGSSMEFEANAPGPVPPERQLAHSKMVPI PAGVFTMGTDDEPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMD
AYEVSNTTEFEKFNSTGYL TEAEKFGDSFVFEGLMLSEQVKTNIQQAVAAAPWWLPVKGANWRHP
EGPDSTILHRPDHPVLHVSWNDAVAYCTWAGKRLPTEAEWEYSCRGGLHNRLFPGNKLQPKGQ
HYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDAFPNGYGLYNI VGNAWEWTSDDWTVHHSVEETLNP
GPPSGKDRVKKGGSYMCHRSYCYRRCARSRQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMDSGRGSHHHH
HHH

8.4 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1 Chemoselektive Derivatisierung von Peptiden und Proteinen.	1
Abbildung 1-2 Postulierter Mechanismus der Racemisierung von FGly.	2
Abbildung 1-3 Derivatisierung von FGly durch Wittig-Reaktionen.	3
Abbildung 1-4 Synthese und Evaluierung von Antikörperfragment-Konjugaten.	4
Abbildung 2-1 Thiol-Michael Addition und NHS-Aktivester.	10
Abbildung 2-2 Konjugationsreaktionen mit nicht-proteinogenen Aminosäuren.	11
Abbildung 2-3 Enzymatische Modifikationen für die Proteinkonjugation.	12
Abbildung 2-4 TE-Mechanismus der Sulfatesterspaltung.	13
Abbildung 2-5 Kristallstrukturen von ΔFGE.	15
Abbildung 2-6 Sequenzvergleich verschiedener FGE Homologen.	16
Abbildung 2-7 Strukturen von prokaryotischen FGE Homologen. ¹	17
Abbildung 2-8 Postulierter Katalysemechanismus nach Peng <i>et al.</i> .	18
Abbildung 2-9 Postulierter Mechanismus nach Rabuka <i>et al.</i> .	19
Abbildung 2-10 Alanin-Scan der FGE-Konsensussequenz.	21
Abbildung 2-11: Vergleich der aktiven Zentren von scFGE (a) und mtbFGE.	21
Abbildung 2-12 Oxim- und Hydrazon-Ligation.	23
Abbildung 2-13 Mechanismus der Wittig-Reaktion.	24
Abbildung 2-14 Pictet-Spengler-Reaktion mit Tryptamin.	25
Abbildung 2-15 <i>iso</i> -Pictet-Spengler-Ligation.	25
Abbildung 2-16 HIPS-Ligation.	26
Abbildung 2-17 <i>trapped</i> -Knoevenagel-Ligation nach Kurdika <i>et al.</i> .	26
Abbildung 2-18 Aufbau eines ADCs.	28
Abbildung 2-19 Ortsspezifischen Konjugation durch FGE.	29
Abbildung 2-20 Antikörperfragmente gerichtet gegen EGFR.	30
Abbildung 4-1: Darstellung der verwendete Größenstandards für die Elektrophorese.	41
Abbildung 5-1 Gradient für die RP-HPLC:	51

Abbildung 5-2: Gradient für die IMAC-Affinitätschromatographie.	100
Abbildung 5-3: Gradient für die AEC.	101
Abbildung 5-4: Gradient für den FGE Aktivitätstest mittels RP-HPLC.	106
Abbildung 6-1 Fehlkupplungen während der Peptidsynthese von 68 .	113
Abbildung 6-2 Syntheseplanung für einen modularen Hydroxylamin-PEG-Linker.	114
Abbildung 6-3 ¹ H-NMR Spektrum des Hydroxylamin-Linkers 10 .	115
Abbildung 6-4 RP-Chromatogramme bei 220 nm.	117
Abbildung 6-5 Syntheseplanung für PEG-Linker.	118
Abbildung 6-6 ESI-MS Spektrum des Amino-PEG-Azid-Linkers 12 .	118
Abbildung 6-7 Syntheseplan für den HIPS-Baustein 24 .	119
Abbildung 6-8 ¹ H-NMR Spektren in CDCl ₃ (*):	121
Abbildung 6-9 Synthese von Fmoc-1,2-Dimethylhydrazin (23).	122
Abbildung 6-10 Syntheseplan für den Pyrazolon-Baustein 38 .	122
Abbildung 6-11 Alternative Syntheseroute für einen Pyrazolon-Baustein 32 .	123
Abbildung 6-12 Synthese von Ethyl-2-hydrazinoacetat 36 .	123
Abbildung 6-13 ¹ H-NMR Spektrum aufgenommen in DMSO-d ₆ (*).	124
Abbildung 6-14 Synthese von Propargyl-Carboxyfluorescein 46a .	125
Abbildung 6-15 Synthese des Fluorophors 55 für die Huisgen-Cycloaddition.	125
Abbildung 6-16 <i>Excitation- emission-scan</i> der hergestellten Fluorophore.	126
Abbildung 6-17 Huisgen-Cycloaddition mit dem Pyrazolon-Baustein.	127
Abbildung 6-18 Analyse der Nebenprodukte der Huisgen-Cycloaddition	128
Abbildung 6-19 Synthese von HIPS-Fluorophor-Bausteinen 59 und 61 .	129
Abbildung 6-20 Chromatogramme der HIPS-Fluorophorbausteine 59 und 61 .	131
Abbildung 6-21 Syntheseplanung für die Immobilisierung von mtbFGE.	132
Abbildung 6-22 ¹ H-NMR-Spektrum des Pyrazolon 43 .	133
Abbildung 6-23 Synthese von stabilisierten Yliden 65 und 65 .	134
Abbildung 6-24 ¹ H-NMR und ³¹ P-NMR Spektrum von Ylid 65 in CDCl ₃ (*).	135
Abbildung 6-25 Zellzahl und Vitalität der <i>High Five</i> -Insektenzellen.	137
Abbildung 6-26 Analyse der Reinigung von ΔFGE.	138
Abbildung 6-27 Analyse der Reinigung von ΔFGE durch SEC.	140
Abbildung 6-28 Analyse der Reinigung von ΔFGE durch AEC.	141
Abbildung 6-29 Reinigung von ΔFGE mittels Ni ²⁺ +Sephrose im <i>batch</i> -Verfahren.	142
Abbildung 6-30 Western Blot Analyse der verschiedenen Expressionsbedingungen.	144
Abbildung 6-31 Analyse der Reinigung von mtbFGE.	145
Abbildung 6-32 SEC von mtbFGE.	147
Abbildung 6-33 AEC von mtbFGE.	148
Abbildung 6-34 Nicht-reduzierender Western Blot der Fraktionen der AEC.	149
Abbildung 6-35 Bestimmung der Enzymaktivität durch Massenspektrometrie.	151
Abbildung 6-36 Vergleich von MALDI-ToF-MS und RP-HPLC.	153
Abbildung 6-37 Umsatzbestimmung mit dem Peptid CS1 .	155
Abbildung 6-38 Optimierung des pH-Wertes und der DTT-Konzentration.	156
Abbildung 6-39 Thiol-Disulfid Austauschreaktion mit DTT.	157
Abbildung 6-40 <i>In vitro</i> Konversion von 70 mit verschiedenen Reduktionsmitteln.	158
Abbildung 6-41 <i>In vitro</i> Umsatz mit mtbFGE.	159
Abbildung 6-42 Umsatz von 70 bei verschiedenen Temperaturen.	160
Abbildung 6-43 Umsatz durch mtbFGE <i>in vitro</i> mit und ohne Begasung von O ₂	161

Abbildung 6-44 Umsatz von 70 unter optimierten Bedingungen.	162
Abbildung 6-45 Umsatz von Peptid 70 mit und ohne Zusatz von 50 μM CuSO_4 .	163
Abbildung 6-46 Umsatz von 70 durch mtbFGE im präparativen Maßstab.	165
Abbildung 6-47 Oxidation von 69 durch mtbFGE-CLEAs.	167
Abbildung 6-48 Umsatz von 69 nach Immobilisierung von mtbFGE.	168
Abbildung 6-49 Tryptischer Verdau mit anschließender MALDI-ToF-MS Analyse.	170
Abbildung 6-50 Vergleich der Aktivität von mtbFGE Wildtyp und Variante.	171
Abbildung 6-51 Immobilisierung von mtbFGE über den FGly- <i>tag</i> .	172
Abbildung 6-52 MALDI-ToF Spektrum von Aldehyd-Peptid 71 .	174
Abbildung 6-53 (A) Differenzspektren der Peptide 68 (Rot) und 71 (Schwarz).	175
Abbildung 6-54 FGly in der Diol- (B) und Enol-Form (C).	176
Abbildung 6-55 NOE-Korrelationen von Peptid 73 .	176
Abbildung 6-56 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Peptid 73 aufgenommen in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$.	177
Abbildung 6-57 Postulierter Mechanismus für die Racemisierung.	178
Abbildung 6-58 HSQC Spektren von Peptid 73 .	179
Abbildung 6-59 Synthese von Peptid 75 mit Ylid 74 in wässriger Lösung.	181
Abbildung 6-60 Reaktionskontrolle mittels RP-HPLC bei 274 nm.	182
Abbildung 6-61 Wittig-Reaktionen mit Aldehyd-Peptiden.	183
Abbildung 6-62 Oxim-Ligation mit den Hydroxylamin-PEG- <i>Beads</i> 14a 14b .	184
Abbildung 6-63 (A) HIPS- und (B) Knoevenagel-Ligation.	188
Abbildung 6-64 SEC der HIPS-scFv-425-Fc Konjugat.	190
Abbildung 6-65 Prozessführung für die Herstellung der HIPS-scFv-425-Fc.	192
Abbildung 6-66 Anregungs-Emissionsspektrum der eingesetzten Farbstoffe.	193
Abbildung 6-67 Tautomerie des Fluorophors 59	194
Abbildung 6-68 <i>live cell imaging</i> mit HeLa Zellen	195
Abbildung 6-69 <i>live cell imaging</i> mit MCF7 Zellen	196
Abbildung 6-70 <i>live cell imaging</i> mit A431 Zellen	197
Abbildung 6-71 Schema für die Bindung und Internalisierung von HIPS-scFv-425-Fc	199
Abbildung 7-1 Immobilisierung von mtbFGE über den Aldehyd- <i>tag</i> .	200
Abbildung 7-2 Mögliche Derivatisierungen von FGly.	201
Abbildung 7-3 Bioorthogonale Derivatisierung von Antikörperfragmenten..	202
Tabelle 2-1 Eigenschaften verschiedener Phosphor-Ylide:	23
Tabelle 5-1: Reaktionsbedingungen bei der SPPS	87
Tabelle 5-2: Mutagenese-PCR-Reaktionsansatz.	93
Tabelle 5-3: Temperaturprofil der Mutagenese-PCR.	94
Tabelle 5-4 Zusammensetzung des Restriktionsverdau.	94
Tabelle 5-5 Parameter für das <i>live cell imaging</i> .	109
Tabelle 6-1: Sequenzen von Substratpeptiden.	112
Tabelle 6-2 Spezifische Aktivitäten von ΔFGE und mtbFGE.	150
Tabelle 6-3 Vergleich von MALDI-ToF-MS und Einwaage.	152
Tabelle 6-4 Abweichungen zwischen RP-HPLC und Einwaage.	154
Tabelle 6-5 Standardreduktionspotentiale und pK_s -Werte der Thiol-Gruppen.	157
Tabelle 6-6 Verhältnis von mtbFGE zu gebundenen Kupfer-Ionen.	163
Tabelle 6-7 Sequenz des mtbFGE Wildtyps und der Variante.	169
Tabelle 6-8 Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen für die Wittig-Reaktion.	181
Tabelle 6-9 Pufferbedingungen für die Konjugation von FGly-scFv-425-Fc.	189

8.5 Erklärung gemäß § 8 Abs. 2 der Promotionsordnung der Fakultät für Chemie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2012 bis Dezember 2016 in der Arbeitsgruppe Organische Chemie III an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Norbert Sewald angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus Werken entnommene Stellen sind unter der Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich habe bisher an keiner anderen Fakultät oder Hochschule einen Antrag auf Zulassung zur Promotion eingereicht und die vorliegende Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung vorgelegt.

Bielefeld, den 05.12.2016

Marcus Gerlach

9. Literaturverzeichnis

- [1] T. Dierks, B. Schmidt, L. V. Borissenko, J. Peng, A. Preusser, M. Mariappan, K. Figura, *Cell*, **2003**, *113*, 435–444.
- [2] M.-A. Frese, T. Dierks, *Chembiochem.*, **2009**, *10*, 425–427.
- [3] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *3*, 321–322.
- [4] M. Knop, T. Q. Q. Dang, G. Jeschke, F. P. Seebeck, *Chembiochem.*, **2016**, DOI: 10.1002/cbic.201600359.
- [5] M. J. Appel, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.*, **2015**, *10*, 72–84.
- [6] P. Agarwal, C. R. Bertozzi, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 176–192.
- [7] P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 9307–9320.
- [8] E. L. Smith, J. P. Giddens, A. T. Iavarone, K. Godula, L.-X. Wang, C. R. Bertozzi, *Bioconjugate Chem.*, **2014**, *25*, 788–795.
- [9] P. Agarwal, J. van der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, C. R. Bertozzi, *PNAS*, **2013**, *110*, 46–51.
- [10] D. Rabuka, J. S. Rush, G. W. deHart, P. Wu, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.*, **2012**, *7*, 1052–1067.
- [11] J. E. Hudak, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. Grob, E. Nogales, C. R. Bertozzi, D. Rabuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 4161–4165.
- [12] P. Agarwal, R. Kudirka, A. E. Albers, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. M. Drake, L. C. Jones, D. Rabuka, *Bioconjugate Chem.*, **2013**, *24*, 846–851.
- [13] P. M. Drake, A. E. Albers, J. Baker, S. Banas, R. M. Barfield, A. S. Bhat, G. W. de Hart, A. W. Garofalo, P. Holder, L. C. Jones et al., *Bioconjugate Chem.*, **2014**, *25*, 1331–1341.
- [14] S. I. Liang, J. M. McFarland, D. Rabuka, Z. J. Gartner, *JACS*, **2014**, *136*, 10850–10853.
- [15] A. E. Albers, A. W. Garofalo, P. M. Drake, R. Kudirka, G. W. de Hart, R. M. Barfield, J. Baker, S. Banas, D. Rabuka, *Euro. J. of Med. Chem.*, **2014**, *88*, 3–9.
- [16] R. Kudirka, R. M. Barfield, J. McFarland, A. E. Albers, G. W. de Hart, P. M. Drake, P. G. Holder, S. Banas, L. C. Jones, A. W. Garofalo et al., *Cell Chem. Biol.*, **2015**, *22*, 293–298.
- [17] P. G. Holder, L. C. Jones, P. M. Drake, R. M. Barfield, S. Banas, G. W. de Hart, J. Baker, D. Rabuka, *JBC*, **2015**, *290*, 15730–15745.
- [18] P. M. Drake, D. Rabuka, *Cur. Opin. Chem. Biol.*, **2015**, *28*, 174–180.
- [19] J. Liu, J. Hanne, B. M. Britton, M. Shoffner, A. E. Albers, J. Bennett, R. Zatezalo, R. Barfield, D. Rabuka, J.-B. Lee et al., *Scientific reports*, **2015**, *5*, 16883.
- [20] D. York, J. Baker, P. G. Holder, L. C. Jones, P. M. Drake, R. M. Barfield, G. T. Bleck, D. Rabuka, *BMC Biotechnol.*, **2016**, *16*, 23.
- [21] R. A. Kudirka, R. M. Barfield, J. M. McFarland, P. M. Drake, A. Carlson, S. Bañas, W. Zmolek, A. W. Garofalo, D. Rabuka, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2016**.
- [22] M. Knop, P. Engi, R. Lemnar, F. P. Seebeck, *Chembiochem.*, **2015**, *16*, 2147–2150.
- [23] A. Wang, F. Du, F. Wang, Y. Shen, W. Gao, P. Zhang, *Biochem. Eng. J.*, **2013**, *73*, 86–92.
- [24] H. Jian, Y. Wang, Y. Bai, R. Li, R. Gao, *Molecules*, **2016**, *21*.

-
- [25] R. Kudirka, D. Rabuka, *American Pharma. Rev.*, **2015**.
- [26] R. von Bulow, B. Schmidt, T. Dierks, K. von Figura, I. Uson, *J. Mol. Biol.*, **2001**, *305*, 269–277.
- [27] R. Kudirka, R. M. Barfield, J. McFarland, A. E. Albers, G. W. de Hart, P. M. Drake, P. G. Holder, S. Banas, L. C. Jones, A. W. Garofalo et al., *Chem. Biol.*, **2015**, *22*, 293–298.
- [28] C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 10030–10074.
- [29] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science*, **2006**, *312*, 217–224.
- [30] N. Krall, C. F. P. da, O. Boutureira, G. J. Bernardes, *Nat. Chem.*, **2016**, *8*, 103–113.
- [31] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, JR, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 7342–7372.
- [32] S. Panowski, S. Bhakta, H. Raab, P. Polakis, Junutula, JR, *mAbs*, **2014**, *6*, 34–45.
- [33] J. M. Reichert, *mAbs*, **2015**, *7*, 1–8.
- [34] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6974–6998.
- [35] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Accounts Chem. Res.*, **2011**, *44*, 666–676.
- [36] C. P. Toseland, *J. Chem. Biol.*, **2013**, *6*, 85–95.
- [37] H. Neumann, S. M. Hancock, R. Buning, A. Routh, L. Chapman, J. Somers, T. Owen-Hughes, J. van Noort, D. Rhodes, J. W. Chin, *Cell*, **2009**, *36*, 153–163.
- [38] J. Lotze, U. Reinhardt, O. Seitz, A. G. Beck-Sickinger, *Mol. BioSys.*, **2016**.
- [39] C. R. Behrens, B. Liu, *mAbs*, **2014**, *6*, 46–53.
- [40] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1540–1573.
- [41] C. Vaklavas, A. Forero-Torres, *Therapeutic advances in hematology*, **2012**, *3*, 209–225.
- [42] S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley, D. V. Santi, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 145–152.
- [43] Am Sochaj, K. W. Swiderska, J. Otlewski, *Biotechnol.*, **2015**, *33*, 775–784.
- [44] Junutula, JR, K. M. Flagella, R. A. Graham, K. L. Parsons, E. Ha, H. Raab, S. Bhakta, T. Nguyen, D. L. Dugger, G. Li et al., *Clin. Canc. Res.*, **2010**, *16*, 4769–4778.
- [45] P. M. LoRusso, D. Weiss, E. Guardino, S. Girish, M. X. Sliwkowski, *Clin. Canc. Res.*, **2011**, *17*, 6437–6447.
- [46] K. A. Poon, K. Flagella, J. Beyer, J. Tibbitts, S. Kaur, O. Saad, J. H. Yi, S. Girish, N. Dybdal, T. Reynolds, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **2013**, *273*, 298–313.
- [47] W. Liu, A. Brock, S. Chen, P. G. Schultz, *Nat. Methods*, **2007**, *4*, 239–244.
- [48] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science*, **2001**, *292*, 498–500.
- [49] H. Neumann, K. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature*, **2010**, *464*, 441–444.
- [50] J. E. Hoffmann, T. Plass, I. Nikic, Aramburu, IV, C. Koehler, H. Gillandt, E. A. Lemke, C. Schultz, *Chemistry*, **2015**, *21*, 12266–12270.
- [51] I. C. Vreja, I. Nikic, F. Gottfert, M. Bates, K. Krohnert, T. F. Outeiro, S. W. Hell, E. A. Lemke, S. O. Rizzoli, *ACS Nano.*, **2015**, *9*, 11034–11041.
- [52] J. Y. Axup, K. M. Bajjuri, M. Ritland, B. M. Hutchins, C. H. Kim, S. A. Kazane, R. Halder, J. S. Forsyth, A. F. Santidrian, K. Stafin et al., *PNAS*, **2012**, *109*, 16101–16106.
- [53] K. Strijbis, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Traffic*, **2012**, *13*, 780–789.
- [54] B. Ramakrishnan, P. K. Qasba, *JBC*, **2002**, *277*, 20833–20839.

- [55] K. Heller, P. Ochtrop, M. F. Albers, F. B. Zauner, A. Itzen, C. Hedberg, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 10327–10330.
- [56] V. Siegmund, S. Schmelz, S. Dickgiesser, J. Beck, A. Ebenig, H. Fittler, H. Frauendorf, B. Piater, U. A. Betz, O. Avrutina et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 13420–13424.
- [57] Y. Sugimura, K. Yokoyama, N. Nio, M. Maki, K. Hitomi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**, *477*, 379–383.
- [58] B. Spolaore, S. Raboni, A. Ramos Molina, A. Satwekar, N. Damiano, A. Fontana, *Biochemistry*, **2012**, *51*, 8679–8689.
- [59] P. Strop, *Bioconj. Chem.*, **2014**, *25*, 855–862.
- [60] T. Dierks, A. Dickmanns, A. Preusser-Kunze, B. Schmidt, M. Mariappan, K. Figura, R. Ficner, M. G. Rudolph, *Cell*, **2005**, *121*, 541–552.
- [61] S. R. Hanson, M. D. Best, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 5736–5763.
- [62] G. Lukatela, N. Krauss, K. Theis, T. Selmer, V. Gieselmann, K. von Figura, W. Saenger, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 3654–3664.
- [63] Q. Fang, J. Peng, T. Dierks, *JBC*, **2004**, *279*, 14570–14578.
- [64] A. Benjdia, G. Deho, S. Rabot, O. Berteau, *FEBS Lett.*, **2007**, *581*, 1009–1014.
- [65] T. Dierks, C. Miech, J. Hummerjohann, B. Schmidt, M. A. Kertesz, K. Figura, *JBC*, **1998**, *273*, 25560–25564.
- [66] T. Dierks, M. R. Lecca, P. Schlotterhose, B. Schmidt, K. Figura, *EMBO J.*, **1999**, *18*, 2084–2091.
- [67] C. Marquardt, Q. Fang, E. Will, J. Peng, K. Figura, T. Dierks, *Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 2212–2218.
- [68] A. Benjdia, S. Subramanian, J. Leprince, H. Vaudry, M. K. Johnson, O. Berteau, *FEBS J.*, **2010**, *277*, 1906–1920.
- [69] J. Landgrebe, T. Dierks, B. Schmidt, K. Figura, *Gene*, **2003**, *316*, 47–56.
- [70] J. S. Rush, C. R. Bertozzi, *JACS*, **2008**, *130*, 12240–12241.
- [71] M. P. Cosma, S. Pepe, I. Annunziata, R. F. Newbold, M. Grompe, G. Parenti, A. Ballabio, *Cell*, **2003**, *113*, 445–456.
- [72] E. C. Ennemann, K. Radhakrishnan, M. Mariappan, M. Wachs, T. H. Pringle, B. Schmidt, T. Dierks, *JBC*, **2013**, *288*, 5828–5839.
- [73] D. Roeser, A. Preusser-Kunze, B. Schmidt, K. Gasow, J. G. Wittmann, T. Dierks, K. Figura, M. G. Rudolph, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 81–86.
- [74] A. Preusser-Kunze, M. Mariappan, B. Schmidt, S. L. Gande, K. Mutenda, D. Wenzel, K. Figura, T. Dierks, *JBC*, **2005**, *280*, 14900–14910.
- [75] J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 4673–4680.
- [76] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipowski, S. Kumar, *Mol. Biol. Evo.*, **2013**, *30*, 2725–2729.
- [77] B. L. Carlson, E. R. Ballister, E. Skordalakes, D. S. King, M. A. Breidenbach, S. A. Gilmore, J. M. Berger, C. R. Bertozzi, *JBC*, **2008**, *283*, 20117–20125.
- [78] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang, *Nat. methods*, **2015**, *12*, 7–8.
- [79] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, *Nat. protocols*, **2010**, *5*, 725–738.
- [80] T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, *PNAS*, **1997**, *94*, 11963–11968.
- [81] J. Fey, M. Balleininger, L. V. Borissenko, B. Schmidt, K. von Figura, T. Dierks, *JBC*, **2001**, *276*, 47021–47028.

-
- [82] J. Peng, S. Alam, K. Radhakrishnan, M. Mariappan, M. G. Rudolph, C. May, T. Dierks, K. von Figura, B. Schmidt, *The FEBS J.*, **2015**, *282*, 3262–3274.
- [83] L. A. Montoya, M. D. Pluth, *Chem. Comm.*, **2012**, *48*, 4767–4769.
- [84] H. Peng, Y. Cheng, C. Dai, A. L. King, B. L. Predmore, D. J. Lefter, B. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 9672–9675.
- [85] M. Wachs, *Dissertation, Universität Bielefeld*, **2014**.
- [86] S. Patai, *The Thiol Group*: John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, **1974**, *2*.
- [87] T. Beuel, *Masterarbeit, Universität Bielefeld* **2015**.
- [88] M. Mariappan, S. L. Gande, K. Radhakrishnan, B. Schmidt, T. Dierks, K. Figura, *JBC*, **2008**, *283*, 11556–11564.
- [89] B. Schmidt, T. Selmer, A. Ingendoh, K. v. Figurat, *Cell*, **1995**, *82*, 271–278.
- [90] C. E. Beesley, D. Burke, M. Jackson, A. Vellodi, B. G. Winchester, E. P. Young, *J. Med. Gen.*, **2003**, *40*, 192–194.
- [91] G. Diez-Roux, A. Ballabio, *Annu. Rev. Gen. Hum. G.*, **2005**, *6*, 355–379.
- [92] C. Szameit, C. Miech, M. Balleininger, B. Schmidt, K. Figura, T. Dierks, *JBC*, **1999**, *274*, 15375–15381.
- [93] T. L. Grove, K.-H. Lee, J. St Clair, C. Krebs, S. J. Booker, *Biochemistry*, **2008**, *47*, 7523–7538.
- [94] S. C. Wang, P. A. Frey, *Trends in Biochem. Sci.*, **2007**, *32*, 101–110.
- [95] A. Benjdia, S. Subramanian, J. Leprince, H. Vaudry, M. K. Johnson, O. Berteau, *FEBS J.*, **2010**, *277*, 1906–1920.
- [96] S. Weiland, *Dissertation, Universität Bielefeld* **2011**.
- [97] P. J. Goldman, T. L. Grove, S. J. Booker, C. L. Drennan, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*, 15949–15954.
- [98] T. A. J. Grell, P. J. Goldman, C. L. Drennan, *J. Biol. Chem.*, **2015**, *290*, 3964–3971.
- [99] A. Dirksen, P. E. Dawson, *Biocon. Chem.*, **2008**, *19*, 2543–2548.
- [100] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *120*, 7633–7636.
- [101] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 7581–7584.
- [102] M. F. Khan, X. Wu, P. J. Boor, G. A. Ansari, *Tox. Sci.*, **1999**, *48*, 134–140.
- [103] D. Rabuka, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 790–796.
- [104] G. Wittig, G. Geissler, *Ann. Chem.*, **1953**, *580*, 44–57.
- [105] R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1411–1416.
- [106] P. A. Byrne, D. G. Gilheany, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6670–6696.
- [107] A. W. Johnson, W. C. Kaska, *Ylides and imines of phosphorus*, Wiley, New York, **1993**.
- [108] M.-J. Han, D.-C. Xiong, X.-S. Ye, *Chem. Comm.*, **2012**, *48*, 11079–11081.
- [109] E. Vedejs, C. F. Marth, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 3905–3909.
- [110] A. El-Batta, C. Jiang, W. Zhao, R. Anness, A. L. Cooksy, M. Bergdahl, *JACS.*, **2007**, *72*, 5244–5259.
- [111] E. D. Cox, J. M. Cook, *Chem. Rev.*, **1995**, *95*, 1797–1842.
- [112] J. Stockigt, A. P. Antonchick, F. Wu, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 8538–8564.
- [113] P. Agarwal, J. van der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, C. R. Bertozzi, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*, 46–51.
- [114] Y. Lee, R. S. Klausen, E. N. Jacobsen, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 5564–5567.

- [115] E. Knoevenagel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1898**, 31, 2596–2619.
- [116] M. L. Deb, P. J. Bhuyan, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 6453–6456.
- [117] S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Takehi, J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, **1989**, 180, 351–357.
- [118] P. Kaatsch, C. Spix, A. Katalinic, S. Hentschel, S. Luttmann, C. Stegmaier, *Robert Koch Institut*, **2015**.
- [119] G. D. Lewis Phillips, G. Li, D. L. Dugger, L. M. Crocker, K. L. Parsons, E. Mai, W. A. Blattler, J. M. Lambert, R. V. J. Chari, R. J. Lutz et al., *Cancer Res.*, **2008**, 68, 9280–9290.
- [120] S. Rostami, I. Qazi, R. Sikorski, *JADC*, **2014**.
- [121] D. J. Elias, L. Hirschowitz, Le Kline, J. F. Kroener, R. O. Dillman, Le Walker, J. A. Robb, R. M. Timms, *Cancer Res.*, **1990**, 50, 4154–4159.
- [122] J. M. Lambert, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2005**, 5, 543–549.
- [123] A. Talavera, R. Friemann, S. Gómez-Puerta, C. Martínez-Fleites, G. Garrido, A. Rabasa, A. López-Requena, A. Pupo, R. F. Johansen, O. Sánchez et al., *Cancer Res.*, **2009**, 69, 5851–5859.
- [124] P. J. Carter, P. D. Senter, *Cancer J.*, **2008**, 14, 154–169.
- [125] H. Bouchard, C. Viskov, C. Garcia-Echeverria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 5357–5363.
- [126] M. C. Finniss, K. S. Chu, C. J. Bowerman, J. C. Luft, Z. A. Haroon, J. M. Desimone, *Med. Chem. Comm.*, **2014**, 5, 1355–1358.
- [127] L. Richwine, *Reuters* **2010**.
- [128] M. Dorywalska, R. Dushin, L. Moine, S. E. Farias, D. Zhou, T. Navaratnam, V. Lui, A. Hasa-Moreno, M. G. Casas, T.-T. Tran et al., *Mol. Cancer Ther.*, **2016**, 15, 958–970.
- [129] R. V. Chari, *Accounts Chem. Res.*, **2008**, 41, 98–107.
- [130] L. Ducry, B. Stump, *Bioconj. Chem.*, **2010**, 21, 5–13.
- [131] A. G. Polson, J. Calemine-Fenaux, P. Chan, W. Chang, E. Christensen, S. Clark, F. J. de Sauvage, D. Eaton, K. Elkins, J. M. Elliott et al., *Cancer Res.*, **2009**, 69, 2358–2364.
- [132] H. H. Sedlacek, *Antibodies as carriers of cytotoxicity*, Karger, Basel, New York, **1992**.
- [133] B. A. Teicher, *Curr. Cancer Drug Tar.*, **2009**, 9, 982–1004.
- [134] B. W. Ennis, M. E. Lippman, R. B. Dickson, *Cancer Inv.*, **1991**, 9, 553–562.
- [135] G. Carpenter, S. Cohen, *Annu. Rev. Biochem.*, **1979**, 48, 193–216.
- [136] S. Li, K. R. Schmitz, P. D. Jeffrey, J. J. W. Wiltzius, P. Kussie, K. M. Ferguson, *Cancer Cell*, **2005**, 7, 301–311.
- [137] J. Schmiedel, A. Blaukat, S. Li, T. Knöchel, K. M. Ferguson, *Cancer Cell*, **2008**, 13, 365–373.
- [138] K. M. Müller, K. M. Arndt, A. Pluckthun, *FEBS Lett.*, **1998**, 432, 45–49.
- [139] R. S. Herbst, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2004**, 59, 21–26.
- [140] G. Falck, L. Rositzka, M. Gerlach, K. Radhakrishnan, N. Sewald, T. Dierks, *Poster ECBC*, **2015**.
- [141] U. Murthy, A. Basu, U. Rodeck, M. Herlyn, A. H. Ross, M. Das, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1987**, 252, 549–560.

-
- [142] U. Horn, W. Strittmatter, A. Krebber, U. Knupfer, M. Kujau, R. Wenderoth, K. Muller, S. Matzku, A. Pluckthun, D. Riesenberger, *Appl. Microbiol. Biot.*, **1996**, *46*, 524–532.
- [143] C. A. Kettleborough, J. Saldanha, V. J. Heath, C. J. Morrison, M. M. Bendig, *Method Enzymol.*, **1991**, *4*, 773–783.
- [144] J. F. DiJoseph, D. C. Armellino, E. R. Boghaert, K. Khandke, M. M. Dougher, L. Sridharan, A. Kunz, P. R. Hamann, B. Gorovits, C. Udata et al., *Blood*, **2004**, *103*, 1807–1814.
- [145] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7512–7515.
- [146] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics*, **2010**, *29*, 2176–2179.
- [147] Y. Mechref, M. V. Novotny, *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **1998**, *9*, 1293–1302.
- [148] K. Kaneshiro, M. Watanabe, K. Terasawa, H. Uchimura, Y. Fukuyama, S. Iwamoto, T.-A. Sato, K. Shimizu, G. Tsujimoto, K. Tanaka, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 7146–7151.
- [149] J. Peng, B. Schmidt, K. Figura, T. Dierks, *J. Mass. Spectrom.*, **2003**, *38*, 80–86.
- [150] S. P. Amaral, M. Fernandez-Villamarin, J. Correa, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 4522–4525.
- [151] F. Hausch, F. Perez-Balderas, *US Patent Application*, **2009**.
- [152] M. Schröder, *Masterarbeit, Universität Bielefeld*, **2013**.
- [153] A. Natarajan, W. Du, C.-Y. Xiong, G. L. DeNardo, S. J. DeNardo, J. Gervay-Hague, *Chem. Commu.*, **2007**, 695–697.
- [154] A. T. Reibel, S. S. Müller, S. Pektor, N. Bausbacher, M. Miederer, H. Frey, F. Rosch, *Biomacromolecules*, **2015**, *16*, 842–851.
- [155] C.-J. Huang, C.-W. Hong, F.-H. Ko, F.-C. Chang, *Soft Matter*, **2011**, *7*, 10850.
- [156] X. Jiang, J. Yang, F. Zhang, P. Yu, P. Yi, Y. Sun, Y. Wang, *Adv. Synth. Catal.*, **2016**, *358*, 2678–2683.
- [157] I. Nicolas, K. Kisseljova, P. Bauchat, M. Baudy-Floc'h, *Synlett*, **2011**, *2011*, 327–330.
- [158] J. D. Macke, L. Field, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 396–402.
- [159] C. Weiß, *Dissertation, Universität Bielefeld*, **2012**.
- [160] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science*, **1988**, *239*, 487–491.
- [161] K. Mullis, F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Cold Spring Harb. Sym.*, **1986**, *51 Pt 1*, 263–273.
- [162] J. W. Engels, F. Lottspeich, *Spektrum Verlag*, **2001**, 1.
- [163] M. P. Weiner, G. L. Costa, W. Schoettlin, J. Cline, E. Mathur, J. C. Bauer, *Gene*, **1994**, *151*, 119–123.
- [164] J. Sambrook, D.W. Russel, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **2001**, 3.
- [165] T.J Wickham, G.R. Nemerow, *Biotechnol. Prog.*, **1993**, 25–30.
- [166] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **1976**, 248–254.
- [167] H. Blum, H. Beier, H. J. Gross, *Electrophoresis*, **1987**, *8*, 93–99.
- [168] D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis*, **1999**, *20*, 3551–3567.
- [169] R. K. Skopes, *Anal. Biochem.*, **1974**.
- [170] Q. Fang, J. Peng, T. Dierks, *JBC*, **2004**, *279*, 14570–14578.

- [171] J. E. Hudak, H. H. Yu, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 16127–16135.
- [172] D. E. DeMong, R. M. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8561–8565.
- [173] J. Rush, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 131–134.
- [174] Milton, R. C. de L., S. C. F. Milton, P. A. Adams, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 6039–6046.
- [175] J. Speck, K. M. Arndt, K. M. Müller, *Protein Eng. Des. Sel.*, **2011**, *24*, 473–484.
- [176] P. Thompson, B. Bezabeh, R. Fleming, M. Pruitt, S. Mao, P. Strout, C. Chen, S. Cho, H. Zhong, H. Wu et al., *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 2085–2096.
- [177] Munch-Petersen, *Org. Synth.*, **1953**, 715.
- [178] Y. Gololobov, I. N. Zhmurova, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 437–472.
- [179] M. S. Gibson, R. W. Bradshaw, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1968**, *7*, 919–930.
- [180] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 7277–7287.
- [181] M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *108*, 2192–2219.
- [182] A. J. Mancuso, D. S. Brownfain, D. Swern, *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 4148–4150.
- [183] E. J. Corey, J. Suggs, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, 2647–2650.
- [184] P. Rollin, P. Sinay, *Carbohydr. Res.*, **1981**, *98*, 139–142.
- [185] E. Quesada, R. J. Taylor, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 6473–6476.
- [186] M. Uchiyama, Y. Kimura, A. Ohta, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 10013–10017.
- [187] D. Dollimore, K. H. Tonge, *J. Chem. Soc.*, **1967**, 1380.
- [188] I. M. Goldman, *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 3289–3295.
- [189] H. Kwart, T. J. George, *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 162–164.
- [190] S. K. Hanson, R. Wu, L. A. P. Silks, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 1908–1911.
- [191] M. Laurencin, P. Bauchat, M. Baudy-Floc'h, *Synthesis*, **2009**, 1007–1013.
- [192] S. Nakamura, H. Hirao, T. Ohwada, *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 4309–4316.
- [193] Y. Oikawa, K. Sugano, O. Yonemitsu, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2087–2088.
- [194] Y. Arano, K. Wakisaka, T. Mukai, T. Uezono, H. Motonari, H. Akizawa, C. Kairiyama, Y. Ohmomo, C. Tanaka, M. Ishiyama et al., *Nucl. Med. Biol.*, **1996**, *23*, 129–136.
- [195] H. Pan, P. Kopeckova, J. Liu, D. Wang, S. C. Miller, J. Kopecek, *Pharm. Res.*, **2007**, *24*, 2270–2280.
- [196] L. Chen, T.-S. Hu, J. Zhu, H. Wu, Z.-J. Yao, *Synlett*, **2006**, *2006*, 1225–1229.
- [197] Y.-H. Zhang, Z.-X. Gao, C.-L. Zhong, H.-B. Zhou, L. Chen, W.-M. Wu, X.-J. Peng, Z.-J. Yao, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 6813–6821.
- [198] L. Chen, F.-Q. Li, B.-H. Hou, G.-F. Hong, Z.-J. Yao, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 8279–8285.
- [199] M. Nahrwold, C. Weiß, T. Bogner, F. Mertink, J. Conradi, B. Sammet, R. Palmisano, S. Royo Gracia, T. Preuße, N. Sewald, *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 1853–1864.
- [200] B. Weidegans, *Dissertation, Universität Regensburg*, **2004**.
- [201] J. A. Mindell, *Annu. Rev. Phys.*, **2012**, *74*, 69–86.
- [202] P. Kele, X. Li, M. Link, K. Nagy, A. Herner, K. Lorincz, S. Beni, O. S. Wolfbeis, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3486–3490.
- [203] P.-C. Cheng, *The Contrast Formation in Optical Microscopy*, **2006**, Springer US, http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-45524-2_8.pdf.
- [204] P. Atkins, *Wiley-VCH*, **2002**, 3. Aufl.

-
- [205] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 210–216.
- [206] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057–3064.
- [207] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596–2599.
- [208] H. A. Orgueira, D. Fokas, Y. Isome, P. C.-M. Chan, C. M. Baldino, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2911–2914.
- [209] A. K. Barik, P. Bandyopadhyay, S. K. Kar, *Polyhedron*, **1998**, *18*, 1–6.
- [210] M. Sobiesiak, T. Muzioł, M. Rozalski, U. Krajewska, E. Budzisz, *New J. Chem.*, **2014**, *38*, 5349–5361.
- [211] S. Bhattacharyya, A. Sarkar, S. K. Dey, G. P. Jose, A. Mukherjee, T. K. Sengupta, *Dalton T.*, **2013**, *42*, 11709–11719.
- [212] T. Krüger, *Masterarbeit, Universität Bielefeld*, **2016**.
- [213] M. R. Lockett, M. F. Phillips, J. L. Jarecki, D. Peelen, L. M. Smith, *Langmuir*, **2008**, *24*, 69–75.
- [214] J. Katz, *Dissertation, Harvard University*, **1998**.
- [215] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6223–6235.
- [216] J. G. Aaronson, L. J. Klein, A. A. Momose, A. M. O'Brien, A. W. Shaw, T. J. Tucker, Y. Yuan, D. M. Tellers, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*, 1723–1728.
- [217] H. G. O. Becker, *Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [218] D. Spitzner, K. Oesterreich, *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, *2001*, 1883–1886.
- [219] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, *90*, 556–557.
- [220] T. G. Kyazimova, E. G. Mamedbeili, A. V. Nagiev, E. I. Suleimanova, K. S. Khalilov, *Russ. J. Appl. Chem.*, **2008**, *81*, 1803–1807.
- [221] M. Zeldin, P. Mehta, W. D. Vernon, *Inorg. Chem.*, **1979**, *18*, 463–466.
- [222] E. C. Ennemann, *Dissertation, Universität Bielefeld*, **2012**.
- [223] S. Alam, *Dissertation, Universität Göttingen*, **2013**.
- [224] H. Yamaji, S. Tagai, H. Fukuda, *J. Biosci. Bioeng.*, **1999**, *87*, 636–641.
- [225] J. A. Bornhorst, J. J. Falke, *Method. Enzymol.*, **2000**, *326*, 245–254.
- [226] M. Wachs, *Diplomarbeit Universität Bielefeld*, **2009**.
- [227] A. L. Horwich, W. A. Fenton, E. Chapman, G. W. Farr, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2007**, *23*, 115–145.
- [228] K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, T. Yura, *Appl. Environ. Microb.*, **1998**, *64*, 1694–1699.
- [229] F. Baneyx, M. Mujacic, *Nat. Biotechnol.*, **2004**, *22*, 1399–1408.
- [230] R. B. Kapust, D. S. Waugh, *Protein science*, **1999**, *8*, 1668–1674.
- [231] V. M. Bolanos-Garcia, O. R. Davies, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1760*, 1304–1313.
- [232] B. Bjellqvist, G. J. Hughes, C. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J. C. Sanchez, S. Frutiger, D. Hochstrasser, *Electrophoresis*, **1993**, *14*, 1023–1031.
- [233] S. Chakravarthi, C. E. Jessop, N. J. Bulleid, *EMBO*, **2006**, *7*, 271–275.
- [234] C. Hwang, A. Sinskey, H. Lodish, *Science*, **1992**, *257*, 1496–1502.
- [235] S. Baron, *Medical microbiology*, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Tex., **1996**.
- [236] C. S. Sevier, C. A. Kaiser, *Nat. Rev.*, **2002**, *3*, 836–847.

- [237] J. Hu, L. Dong, C. E. Outten, *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 29126–29134.
- [238] A. Albalat, A. Stalmach, V. Bitsika, J. Siwy, J. P. Schanstra, A. D. Petropoulos, A. Vlahou, J. Jankowski, F. Persson, P. Rossing et al., *Proteomics*, **2013**, *13*, 2967–2975.
- [239] W. Rick, M. Hockeborn, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **1982**, 745–752.
- [240] J. C. Wilks, J. L. Slonczewski, *J. Bacteriol.*, **2007**, *189*, 5601–5607.
- [241] R. Singh, G. V. Lamoureux, W. J. Lees, G. M. Whitesides, *Methods Enzymol.*, **1995**, *251*, 167–173.
- [242] E. B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P. R. Selvin, *Anal. Biochem.*, **1999**, *273*, 73–80.
- [243] J. C. Lukesh, M. J. Palte, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 4057–4059.
- [244] L. Peng, X. Xu, M. Guo, X. Yan, S. Wang, S. Gao, S. Zhu, *Metallomics*, **2013**, *5*, 920–927.
- [245] D. A. Keire, E. Strauss, W. Guo, B. Noszal, D. L. Rabenstein, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 123–127.
- [246] W. P. Jencks, K. Salvesen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 4433–4436.
- [247] K. K. Millis, K. H. Weaver, D. L. Rabenstein, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 4144–4146.
- [248] A. K. Tummanapelli, S. Vasudevan, *J. Phys. Chem.*, **2015**, *119*, 15353–15358.
- [249] G. M. Whitesides, J. E. Lilburn, R. P. Szajewski, *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 332–338.
- [250] C. A. Vega, R. A. Butler, B. Perez, C. Torres, *J. Chem. Eng. Data*, **1985**, *30*, 376–379.
- [251] A. A. El-Harakany, F. M. Abdel Halim, A. O. Barakat, *J. Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1984**, *162*, 285–305.
- [252] S. Tomita, Y. Nagasaki, K. Shiraki, *Biotechnol. Bioeng.*, **2012**, *109*, 2543–2552.
- [253] W. Wang, *Int. J. Pharma.* **2005**, *289*, 1–30.
- [254] S. Yamaguchi, E. Yamamoto, T. Mannen, T. Nagamune, *Biotechnol. J.*, **2013**, *8*, 17–31.
- [255] T. Matsuoka, H. Hamada, K. Matsumoto, K. Shiraki, *Biotechnol. Progress*, **2009**, *25*, 1515–1524.
- [256] Weiss, *Solubility of Nitrogen, Oxygen and Argon in Water and Seawater*, **1970**, *17*, 721–735.
- [257] *Cold Spring Harbor Protocols*, **2010**, DOI:10.1101/pdb.tab4top79.
- [258] A. E. Cho, W. A. Goddard, *Metalloproteins: Theory, Calculations, and Experiments*, CRC Press, **2015**.
- [259] J. Rush, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 131–134.
- [260] A. S. Bommarius, M. F. Paye, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6534–6565.
- [261] M. Frese, N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 298–301.
- [262] R. A. Sheldon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2011**, *92*, 467–477.
- [263] P. Schmidt-Winkel, W. W. Lukens, D. Zhao, P. Yang, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 254–255.
- [264] L. M. Azofra, M. M. Quesada-Moreno, I. Alkorta, J. R. Aviles-Moreno, J. Elguero, J. J. Lopez-Gonzalez, *Chemphyschem.*, **2015**, *16*, 2226–2236.
- [265] R. Peschla, B. C. García, M. Albert, C. Kreiter, G. Maurer, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2003**, *42*, 1508–1516.
- [266] M. Recksiek, T. Selmer, T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 6096–6103.

-
- [267] M. Loos, C. Gerber, F. Corona, J. Hollender, H. Singer, *Anal. Chem.*, **2015**, *87*, 5738–5744.
- [268] W. Gottwald, G. Wachter, *IR-Spektroskopie für Anwender*, Wiley-VCH, Weinheim, Berlin, **1997**.
- [269] V. Buch, *J. Chem. Phys.*, **2004**, *121*, 6961–6966.
- [270] SDBSWeb, http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/cre_index.cgi, **2012**.
- [271] M. Jones, *Org. Chem.*, W.W. Norton & Company, New York, London, **2005**.
- [272] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 102 Tabellen*, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [273] V. Bertolasi, P. Gilli, V. Ferretti, G. Gilli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 4917–4925.
- [274] Q. Kaas, R. Yu, A.-H. Jin, S. Dutertre, D. J. Craik, *Nucleic Acids Res.*, **2012**, *40*, D325–30.
- [275] J. Weidmann, D. J. Craik, *J. Exp. Bot.*, **2016**, *67*, 4801–4812.
- [276] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 633–684.
- [277] H. J. Bestmann, B. Arnason, *Chem. Ber.*, **1962**, *95*, 1513–1527.
- [278] S. C. Jeffrey, M. T. Nguyen, R. F. Moser, D. L. Meyer, J. B. Miyamoto, P. D. Senter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 2278–2280.
- [279] R. R. Burgess, M. P. Deutscher *Methods in enzymology*, Elsevier Acad. Press, Amsterdam, **2009**.
- [280] H. Wimmer, M. Olsson, M. T. Petersen, R. Hatti-Kaul, S. B. Peterson, N. Müller, *J. Biotechnol.*, **1997**, *55*, 85–100.
- [281] L. L. Chang, D. Shepherd, J. Sun, X. C. Tang, M. J. Pikal, *J. Pharma. Sci.*, **2005**, *94*, 1445–1455.
- [282] A. P. Golovanov, G. M. Hautbergue, S. A. Wilson, L.-Y. Lian, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8933–8939.
- [283] A. Ettinger, T. Wittmann, *Method Cell Biol.*, **2014**, *123*, 77–94.
- [284] M. V. Seiden, H. A. Burris, U. Matulonis, J. B. Hall, D. K. Armstrong, J. Speyer, J. D. A. Weber, F. Muggia, *Gynecol. Oncol.*, **2007**, *104*, 727–731.
- [285] J. Harper, S. Mao, P. Strout, A. Kamal, *Method Mol. Biol.*, **2013**, *1045*, 41–49.
- [286] C. M. Stoscheck, G. Carpenter, *J. Cell. Physiol.*, **1984**, *120*, 296–302.
- [287] L. Henriksen, M. V. Grandal, S. L. J. Knudsen, B. van Deurs, L. M. Grovdal, *PloS one*, **2013**, *8*, e58148.
- [288] I. V. Peshenko, E. V. Olshevskaya, A. M. Dizhoor, *JBC.*, **2008**, *283*, 21747–21757.
- [289] H. Xu, S.-J. Lee, E. Suzuki, K. D. Dugan, A. Stoddard, H.-S. Li, L. A. Chodosh, C. Montell, *EMBO.*, **2004**, *23*, 811–822.
- [290] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *Chemphyschem.*, **2008**, *9*, 2019–2027.
- [291] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid et al., *Nat. Met.*, **2012**, *9*, 676–682.
- [292] C. R. Hopkins, A. Gibson, M. Shipman, K. Miller, *Nature*, **1990**, *346*, 335–339.
- [293] L. K. Goh, A. Sorkin, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2013**, *5*, a017459.
- [294] R. C. de Figueiredo, M. J. Soares, *Parasitol. Res.*, **2000**, *86*, 413–418.
- [295] S. M. Wales, K. A. Hammer, K. Somphol, I. Kemker, D. C. Schroder, A. J. Tague, Z. Brkic, A. M. King, D. Lyras, T. V. Riley et al., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 10813–10824.
- [296] J. Che, M. S. Raghavendra, Y. Lam, *J. Comb. Chem.*, **2009**, *11*, 378–384.

- [297] R. I. Fisher, E. R. Gaynor, S. Dahlberg, M. M. Oken, T. M. Grogan, E. M. Mize, J. H. Glick, C. A. Coltman, JR, T. P. Miller, *J. Med.*, **1993**, *328*, 1002–1006.
- [298] K. Koskela, T. T. Pelliniemi, K. Remes, *Leukemia Lymphoma*, **1993**, *10*, 347–351.
- [299] Y. L. Boersma, G. Chao, D. Steiner, K. D. Wittrup, A. Plückthun, *JBC*, **2011**, *286*, 41273–41285.