

**MARKIERUNG, MANIPULATION UND STRUKTURIERTE  
ORGANISATION VON PROTEINEN  
MIT MULTIVALENTEN NTA-CHELATOREN**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität Frankfurt am Main

von  
**Katrin Schulze**  
aus Schleswig

Frankfurt am Main, 2009

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Tampé

2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

Datum der Disputation:

## VERÖFFENTLICHUNGEN:

- **Schulze, K.**, Mulder, A., Tinazli, A. & Tampé, R. Controlling the activity of the 20S proteasome complex by synthetic gatekeepers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 5702-5705 (2006).
- van der Does, C., Presenti, C., **Schulze, K.**, Dinkelaker, S. & Tampé, R. Kinetics of the ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of Mdl1 studied by a novel site-specific labeling technique. *J. Biol. Chem.* **281**, 5694-5701 (2006).
- Plewnia, G., **Schulze, K.**, Hunte, C., Tampé, R. & Koch, J. Modulation of the antigenic peptide transporter TAP by recombinant antibodies binding to the last five residues of TAP1. *J. Mol. Biol.* **369**, 95-107 (2007).
- Ludden, M.J., Mulder, A., **Schulze, K.**, Subramaniam, V., Tampé, R. & Huskens, J. Anchoring of histidine-tagged proteins to molecular printboards: self-assembly, thermodynamic modeling, and patterning. *Chemistry* **14**, 2044-2051 (2008).
- Watschinger, K., Horak, S.B., **Schulze, K.**, Obermair, G.J., Wild, C., Koschak, A., Sinnegger-Brauns, M.J., Tampé, R. & Striessnig, J. Functional properties and modulation of extracellular epitope-tagged Ca(V)2.1 voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)* **2**, 461-473 (2008).
- Wruss, J., Pollheimer, P.D., Meindl, I., Reichel, A., **Schulze, K.**, Schöffberger, W., Piehler, J., Tampé, R., Blaas, D. & Gruber H.J. Conformation of receptor adopted upon interaction with virus revealed by site-specific fluorescence quenchers and FRET-analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5478-5482 (2009).
- Herget, M., Kreissig, N., Kolbe, C., Schölz, C., **Schulze, K.**, Tampé, R., Abele, R. Purification and reconstitution of the antigen transport complex TAP: A prerequisite for determination of peptide stoichiometry, ATP binding and hydrolysis. eingereicht bei *J. Biol. Chem.*, (2009).
- **Schulze, K.**, Grunwald, C., Knaus, H., Reichel, A., Weiss, V., Blaas, D., Piehler, J., Wiesmüller, K.H., Tampé, R. Photons trigger nanomolar interaction for *in situ* organization of macromolecular complexes. *Manuskript in Vorbereitung*.

# **MEINER FAMILIE**

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. ROBERT TAMPÉ danke ich besonders für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit, meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen, die gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung meiner Themen und die anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. ALEXANDER HECKEL danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Für seine unermüdliche Hilfe bei Fragen zur Peptidsynthese und der Synthese immer neuer Peptide danke ich Herrn Prof. Dr. KARL-HEINZ WIESMÜLLER (EMC microcollections) ganz herzlich.

Ein besonderer Dank geht an GERHARD SPATZ-KÜMBEL für die unvergessliche Zeit im Labor und die niemals endende Hilfsbereitschaft in (fast) allen Lebenslagen.

Dr. ALART MULDER danke ich ganz herzlich für die gemeinsame Zeit im Chemielabor, die zahllosen hilfreichen Anregungen und die entstandene Freundschaft.

Ich danke Dr. DAVID PARCEJ für seine Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie und bei aufkommenden Fragen zur englischen Sprache.

Für seine Hilfe auf dem Projekt der photoaktivierbaren NTA-Verbindungen und die vielen amüsanten und aufschlussreichen Stunden vor dem Fluoreszenzmikroskop möchte ich Dr. CHRISTIAN GRUNWALD herzlich danken.

PD Dr. RUPERT ABELE danke ich für das Rumschrauben an der HPLC und die vielen hilfreichen Ratschläge während meiner Promotion.

Ich danke VIKTOR WEISS und Prof. Dr. DIETER BLAAS von der Medizinischen Universität Wien für die Bereitstellung von Cy5-markiertem HRV2 und dem dazugehörigen Rezeptorfragment.

ANNETT REICHEL danke ich für die nahezu unendliche Bereitstellung von MBP in allen Variationen. Ihr und DIRK PATEROK danke ich außerdem für die stetige Diskussionsbereitschaft rund um das Thema NTA-Chelatoren und für ihre Freundschaft.

Mein Dank gilt allen aktuellen und früheren Mitgliedern der Nanobiotech-Gruppe für hilfreiche und anregende Diskussionen, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Allen jetzigen und ehemaligen Kollegen des Instituts für Biochemie danke ich für die freundliche und verständnisvolle Aufnahme einer Chemikerin in ihre Reihen. Mein besonderer Dank bei der Hilfe mit alltäglichen Dingen gilt CHRISTINE LE GAL, GUDRUN ILLIG, RENATE GUNTRUM, ECKHARD LINKER und Dr. HANS BÄUMERT.

Für die gemeinsam verbrachte Zeit im Labor und die daraus entstandenen Freundschaften möchte ich mich ganz herzlich bei SIMONE GOMPF, CHIARA PRESENTI, ARIANE ZUTZ, CHRISTIAN SCHÖLZ, DOMINIK BARTHELME, MEIKE HERGET, RUTA ALMEDOM, GABY PLEWNIA, NINA KREIßIG und HELGE GROßMANN bedanken.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meine ELTERN, meinen BRUDER und meine OMA für ihre unerschöpfliche Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ohne sie wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem danke ich STEFAN von ganzem Herzen für seine Hilfe und sein Verständnis während meiner Promotionszeit.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>I.1</b>	<b>Proteinmodifikationen in Lösung.....</b>	<b>3</b>
I.1.1	Protein-Spleißen mit Inteinen .....	5
I.1.1.1	Protein-Spleißen in <i>trans</i> .....	6
I.1.1.2	Intein-vermittelte Proteinverknüpfung .....	7
I.1.2	Enzymatische Modifikationen .....	8
I.1.2.1	Biotin-Ligase BirA .....	8
I.1.2.2	Phosphopantetheinyl-Transferasen .....	9
I.1.3	Kovalente Selbst-Modifikationen .....	10
I.1.3.1	hAGT-Tag .....	10
I.1.3.2	Halo-Tag .....	11
I.1.4	Reversible Modifikationen.....	12
I.1.4.1	Tetracystein-Tag .....	12
I.1.4.2	Histidin-Tag .....	13
<b>I.2</b>	<b>Proteinimmobilisierung.....</b>	<b>17</b>
I.2.1	Herstellungsstrategien für Proteinbiochips .....	18
I.2.1.1	PEGylierung von Glasoberflächen .....	18
I.2.1.2	Modifikation von Goldoberflächen .....	20
I.2.2	Immobilisierung von Proteinen.....	21
I.2.2.1	Immobilisierung auf NTA-Oberflächen .....	22
I.2.2.2	Methoden zur Strukturierung von NTA-Oberflächen .....	23
I.2.2.2.1	Drucken von Alkylthiolen .....	23
I.2.2.2.2	Native Protein-Nanolithographie.....	24
I.2.2.2.3	Elektronenstrahl-Lithographie.....	25
I.2.2.2.4	Photo-Lithographie.....	25
<b>II</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>27</b>
<b>II.1</b>	<b>Fluoreszente <i>tris</i>NTAs mit verbesserter Quantenausbeute .....</b>	<b>27</b>
<b>II.2</b>	<b>Manipulation makromolekularer Proteinkomplexe .....</b>	<b>27</b>
<b>II.3</b>	<b><i>tris</i>NTA modifizierte Goldcluster.....</b>	<b>28</b>
<b>II.4</b>	<b>Orthogonale <i>bis</i>NTAs .....</b>	<b>28</b>
<b>II.5</b>	<b>Aktivierbare <i>tris</i>NTAs.....</b>	<b>28</b>
<b>III</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>29</b>
<b>III.1</b>	<b>Oberflächenplasmonresonanz .....</b>	<b>29</b>

---

III.1.1	Physikalisches Prinzip.....	29
III.1.2	Umsetzung im SPR-Spektrometer .....	31
<b>III.2</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>32</b>
III.2.1	Theorie zur Fluoreszenz.....	32
III.2.2	Einsatz in der Mikroskopie .....	35
III.2.2.1	Konfokale Laser-Rastermikroskopie .....	35
III.2.2.2	Totalinterne Reflektions-Fluoreszenzmikroskopie.....	36
<b>III.3</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie .....</b>	<b>38</b>
<b>IV</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>41</b>
<b>IV.1</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>41</b>
IV.1.1	Expression und Reinigung His-getagter Proteine.....	41
IV.1.1.1	Überexpression der Proteine .....	41
IV.1.1.2	Zellaufschluss .....	42
IV.1.1.3	Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie.....	42
IV.1.1.4	Präparative Gelfiltrationen.....	43
IV.1.2	Analytische Gelfiltrationen .....	44
IV.1.2.1	20S Proteasome.....	44
IV.1.2.2	MBP-H <sub>6</sub> mit <i>tris</i> NTA-Nanogold® .....	44
IV.1.2.3	MBP-H <sub>6</sub> mit photoaktivierbaren <i>tris</i> NTAs (P <i>At</i> risNTAs).....	45
IV.1.2.4	Kalibrierung der Superdex <sup>TM</sup> 200 PC 3.2/30 Säule.....	45
IV.1.3	Markierung des 20S Proteasoms mit multivalenten Chelatorköpfen.....	46
IV.1.4	Bestimmung der Zahl gebundener Chelatorköpfe pro 20S Proteasom.....	46
IV.1.5	Bicinchoninsäure-Test .....	46
IV.1.6	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	47
IV.1.7	Färben von Polyacrylamid-Gelen .....	48
IV.1.7.1	Coomassie-Färbung .....	48
IV.1.7.2	Detektion von Nanogold®.....	48
IV.1.8	Peptidaseaktivität des 20S Proteasoms im Nativgel .....	48
<b>IV.2</b>	<b>Chemische Methoden .....</b>	<b>49</b>
IV.2.1	Modifizierung der multivalenten Chelatorköpfe.....	49
IV.2.1.1	Umsetzung aminofunktionalisierter Chelatoren mit Fluorophoren ....	49
IV.2.1.2	Umsetzung von Thio- <i>tris</i> NTA mit Fluorophoren.....	50
IV.2.1.3	Umsetzung von Thio- <i>tris</i> NTA mit Monomaleimido-Nanogold®.....	50
IV.2.1.3.1	Verunreinigtes Thio- <i>tris</i> NTA.....	50



---

IV.2.1.3.2	Reines Thio- <i>tris</i> NTA.....	51
IV.2.2	Peptidmodifikationen mit Carboxy- <i>tris</i> NTA( <i>Or</i> Bu).....	51
IV.2.2.1	Kupplung an Polyprolinpeptide.....	52
IV.2.2.2	Kupplung an photolabile Histidin-Peptide.....	53
IV.2.2.3	Chloranil-Test.....	54
IV.2.2.4	Kaiser-Test.....	54
IV.2.2.5	Abspaltung und Aufarbeitung der <i>tris</i> NTA-Peptide.....	55
IV.2.3	Fluoreszenzmarkierung von <i>tris</i> NTA-Peptiden.....	57
IV.2.4	Beladen der Chelatorköpfe mit Nickelionen.....	58
IV.2.5	Mikroskopieoberflächen mit PA <i>tris</i> NTA.....	59
IV.2.6	Spaltung der photoaktivierbaren <i>tris</i> NTAs.....	59
IV.2.6.1	Photoinduzierte Peptidspaltung in Lösung.....	59
IV.2.6.2	Komplexbildung zwischen PA <i>tris</i> NTAs und MBP-H <sub>6</sub> .....	60
IV.2.6.3	Photoinduzierte Peptidspaltung auf SPR-Oberflächen.....	60
IV.2.6.4	Photoinduzierte Peptidspaltung auf Mikroskopieoberflächen.....	60
IV.2.6.4.1	Strukturierung mittels Maskenlithographie.....	60
IV.2.6.4.2	Strukturierung mittels Laserlithographie.....	61
IV.2.7	Präparation einer His <sub>6</sub> -Säule.....	61
<b>IV.3</b>	<b>Biophysikalische Methoden.....</b>	<b>62</b>
IV.3.1	UV/Vis Spektroskopie.....	62
IV.3.1.1	Konzentrationsbestimmung der verwendeten Proteine.....	62
IV.3.1.2	Konzentrationsbestimmung von fluoreszenzmarkierten Substanzen.....	63
IV.3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nanogold®.....	63
IV.3.1.4	Konzentrationsbestimmung der rigiden <i>bis</i> NTAs.....	63
IV.3.2	Fluoreszenzspektroskopie.....	64
IV.3.2.1	Aufnahme von Fluoreszenzspektren.....	64
IV.3.2.2	Abbau von Fluoreszein-markiertem Casein.....	64
IV.3.2.3	Grundlagen der Fluoreszenztitration.....	64
IV.3.2.4	Durchführung von Fluoreszenztitrationen.....	67
IV.3.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	68
IV.3.3.1	CLS-Mikroskopie mit PA <i>tris</i> NTA-Oberflächen.....	68
IV.3.3.2	TIRF-Mikroskopie mit PA <i>tris</i> NTA-Oberflächen.....	69
IV.3.4	Elektronenmikroskopie mit 20S Proteasomkomplexen.....	69
IV.3.5	Oberflächenplasmonresonanz mit PA <i>tris</i> NTA-Oberflächen.....	70

---

<b>V</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>72</b>
<b>V.1</b>	<b>Fluoreszente <i>tris</i>NTAs mit verbesserter Quantenausbeute .....</b>	<b>72</b>
V.1.1	Hintergrund .....	72
V.1.2	Ergebnisse und Diskussion .....	74
V.1.2.1	Synthese der <i>tris</i> NTA-Polyprolinpeptide .....	74
V.1.2.2	Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten .....	79
V.1.2.3	Stabile Komplexbildung His-getaggtter Proteine .....	82
V.1.2.4	Selektive Markierung His-getaggtter Proteine .....	83
V.1.2.5	Charakterisierung von ABC-Transportern.....	84
V.1.2.5.1	ATP-Hydrolyse von MDL1 <sup>204</sup> .....	85
V.1.2.5.2	ATP-Bindung von TAP <sup>205</sup> .....	87
V.1.3	Schlussfolgerung.....	88
V.1.4	Ausblick .....	88
<b>V.2</b>	<b>Aktivitätskontrolle des 20S Proteasoms .....</b>	<b>90</b>
V.2.1	Hintergrund .....	90
V.2.2	Ergebnisse und Diskussion .....	92
V.2.2.1	Spezifische Bindung der MCHs .....	92
V.2.2.2	Anzahl der gebundenen MCHs pro 20S Proteasomkomplex .....	93
V.2.2.3	Spezifische Markierung in Zelllysaten .....	94
V.2.2.4	Peptidase-Aktivität der markierten 20S Proteasomkomplexe .....	95
V.2.2.5	Reversible Blockierung des $\alpha$ N-His <sub>6</sub> Proteasoms.....	96
V.2.3	Schlussfolgerung.....	98
V.2.4	Ausblick .....	98
<b>V.3</b>	<b>Nanogold® modifiziertes <i>tris</i>NTA.....</b>	<b>99</b>
V.3.1	Hintergrund .....	99
V.3.2	Ergebnisse und Diskussion .....	101
V.3.2.1	Synthese von Thio- <i>tris</i> NTA mit 3-Tritylsufanylpropionsäure .....	101
V.3.2.2	Modifikation des Monomaleimido-Nanogoldes®.....	103
V.3.2.3	Stabile Komplexbildung des 20S Proteasoms .....	104
V.3.2.4	Anzahl gebundener <i>tris</i> NTA(Nanogold®)-Partikel .....	105
V.3.2.5	Peptidaseaktivität des markierten des 20S Proteasoms .....	106
V.3.2.6	Elektronenmikroskopie mit dem 20S Proteasom.....	107
V.3.2.7	Stabile Komplexbildung mit MBP-H <sub>6</sub> .....	114
V.3.2.8	Synthese von Thio- <i>tris</i> NTA mit 3,3'-Dithiopropionsäure .....	119

---

V.3.2.9	Darstellung von <i>tris</i> NTA(NG).....	120
V.3.2.10	Stabile Komplexierung von MBP-H <sub>6</sub> .....	122
V.3.3	Schlussfolgerung.....	123
V.3.4	Ausblick.....	124
<b>V.4</b>	<b>Orthogonale <i>bis</i>NTAs.....</b>	<b>125</b>
V.4.1	Hintergrund.....	125
V.4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	126
V.4.2.1	Synthese der rigiden <i>bis</i> NTA-Chelatorköpfe.....	126
V.4.2.2	Verwendete His- <i>Tags</i> .....	127
V.4.2.3	Bestimmung der Dissoziationskonstanten.....	128
V.4.3	Schlussfolgerung.....	129
V.4.4	Ausblick.....	130
<b>V.5</b>	<b>Photoaktivierbare <i>tris</i>NTAs.....</b>	<b>131</b>
V.5.1	Hintergrund.....	131
V.5.2	Ergebnisse und Diskussion.....	134
V.5.2.1	Design und Synthese der P <i>A</i> <i>tris</i> NTAs.....	134
V.5.2.2	Photoinduzierte Spaltung in Lösung.....	136
V.5.2.2.1	Reaktionskontrolle mittels RP-HPLC.....	136
V.5.2.2.2	Reaktionskontrolle mittels UV/Vis-Spektroskopie.....	137
V.5.2.3	Fluoreszenzmarkierung der P <i>A</i> <i>tris</i> NTAs.....	138
V.5.2.3.1	Fluoreszenzintensitäten.....	140
V.5.2.4	Stabile Komplexbildung mit MBP-H <sub>6</sub> .....	140
V.5.2.5	Photoinduzierte Aktivierung an Oberflächen.....	144
V.5.2.5.1	Stabile Immobilisierung His- <i>getaggt</i> er Proteine.....	144
V.5.2.5.2	Visualisierung immobilisierter Proteine.....	152
V.5.2.5.2.1	Strukturierung von P <i>A</i> <i>tris</i> NTA-Oberflächen.....	152
V.5.2.5.2.2	Strukturierte Immobilisierung His- <i>getaggt</i> er Proteine.....	153
V.5.2.5.2.3	Strukturierte Immobilisierung biologisch aktiver Proteine.....	155
V.5.3	Schlussfolgerung.....	157
V.5.4	Ausblick.....	157
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>160</b>
<b>VI.1</b>	<b>Summary.....</b>	<b>163</b>
<b>VII</b>	<b>CHEMISCHE SYNTHESSEN.....</b>	<b>166</b>
<b>VII.1</b>	<b>Synthese von <i>tris</i>NTA und <i>tris</i>NTA-Derivaten.....</b>	<b>166</b>

---

VII.1.1	Glu-NTA( <i>Or</i> Bu)-OBzl (52) .....	166
VII.1.2	Glu-NTA( <i>Or</i> Bu) (55) .....	166
VII.1.3	<i>tris</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (20) .....	167
VII.1.4	Carboxy- <i>tris</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (1) .....	167
VII.1.5	Boc- $\epsilon$ -Aminocaprönsäure- <i>tris</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (58).....	168
VII.1.6	Aminocaprönsäure- <i>tris</i> NTA (11).....	169
VII.1.7	Trt-Sulfanylpropionsäure- <i>tris</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (22) .....	169
VII.1.8	Thio- <i>tris</i> NTA (19) .....	170
VII.1.9	Dithiopropionsäure- <i>tris</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (24).....	170
VII.1.10	Dithiopropionsäure- <i>tris</i> NTA (25).....	171
VII.1.11	Thio- <i>tris</i> NTA (19) .....	171
<b>VII.2</b>	<b>Synthese von <i>tetrakis</i>NTA (12).....</b>	<b>172</b>
VII.2.1	Z-Lys-NTA( <i>Or</i> Bu) (60) .....	172
VII.2.2	Lys-NTA( <i>Or</i> Bu) (62) .....	172
VII.2.3	Z- <i>bis</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (63).....	173
VII.2.4	<i>bis</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (65).....	173
VII.2.5	Z- <i>tetrakis</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (66).....	174
VII.2.6	<i>tetrakis</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (67) .....	174
VII.2.7	<i>tetrakis</i> NTA (12).....	175
<b>VII.3</b>	<b>Synthese der rigiden <i>bis</i>NTA-Chelatorköpfe .....</b>	<b>176</b>
VII.3.1	Nitrophenyl- <i>ortho-bis</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (70) .....	176
VII.3.2	Nitrophenyl- <i>ortho-bis</i> NTA (28) .....	177
VII.3.3	2-Nitrobenzidin (27) .....	178
VII.3.4	Nitrobenzidin- <i>bis</i> NTA( <i>Or</i> Bu) (72) .....	178
VII.3.5	Nitrobenzidin- <i>bis</i> NTA (29) .....	179
<b>VIII</b>	<b>LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN .....</b>	<b>180</b>
<b>VIII.1</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>180</b>
VIII.1.1	Allgemein verwendete Puffer .....	180
VIII.1.2	Zellkultur.....	180
VIII.1.3	Chromatographien.....	180
VIII.1.3.1	Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie.....	180
VIII.1.3.2	Größenausschlusschromatographie .....	181
VIII.1.3.3	Anionenaustauschchromatographie .....	181
VIII.1.3.4	<i>Reversed-phase</i> HPLC.....	181

---

VIII.1.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	182
VIII.1.4.1	Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen .....	182
VIII.1.4.2	Peptidaseaktivität im Nativgel .....	182
VIII.1.5	Festphasenkupplung.....	183
VIII.1.5.1	Abspaltungslösungen.....	183
VIII.1.5.2	Chloranil-Test .....	183
VIII.1.5.3	Kaiser-Test.....	183
VIII.1.6	Fluoreszenzspektroskopie .....	183
VIII.1.7	Fluoreszenzmikroskopie .....	183
VIII.1.8	Oberflächenplasmonresonanz .....	184
VIII.1.9	Präparation einer His <sub>6</sub> -Säule .....	184
<b>VIII.2</b>	<b>Verwendete Chemikalien .....</b>	<b>185</b>
<b>IX</b>	<b>GERÄTE &amp; VERBRAUCHSMATERIALIEN .....</b>	<b>187</b>
<b>X</b>	<b>VERWENDETE ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>189</b>
<b>XI</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>192</b>
<b>XII</b>	<b>STRUKTURFORMELN.....</b>	<b>207</b>
<b>XIII</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>211</b>

## I EINLEITUNG

Seit der erfolgreichen Entschlüsselung des humanen Genoms<sup>1</sup> befinden sich die Biowissenschaften in der Post-Genom-Ära, die sich hauptsächlich der Erforschung des Proteoms widmet. Der Begriff „Proteom“ wurde im Jahre 1996 von WILKINS et al. geprägt<sup>2</sup> und umfasst alle zu einem definierten Zeitpunkt in einer Zelle oder einem Gewebe vorkommenden Proteine. Dabei gilt es zu beachten, dass sich das Proteom im Laufe der Zeit in Hinblick auf seine Proteinzusammensetzung verändern kann. Diese Dynamik ist so im Genom nicht zu finden und stellt eine der großen Herausforderungen dar. Die Proteomik ist demzufolge die Lehre, die sich mit der Erforschung des Proteoms beschäftigt. Eine genaue Kenntnis über dieses Feld ist deshalb so wichtig, weil Proteine den Großteil der biologischen Funktionen in einer Zelle übernehmen. Um zu verstehen, wie Abläufe in einer Zelle funktionieren, müssen daher Kenntnisse über die Proteinzusammensetzung, die Proteininteraktionen und die Aufgaben der einzelnen Proteine gesammelt werden. Neben den Biowissenschaften verspricht sich vor allem die Medizin großen Nutzen aus der Proteomik. Durch die Analyse komplexer Vorgänge in Zellen und deren Einfluss auf den Organismus sollte es möglich sein, effizientere Ansätze für die frühe Diagnose oder Behandlung von Krankheiten zu entwickeln. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf Krankheiten gelegt, die vermutlich durch eine Störung bestimmter Signalkaskaden hervorgerufen werden (z.B. Krebs).

Im Vergleich zur Genomik stellt die Proteomik ein wesentlich komplexeres Feld dar. So muss mit geringen und teilweise veränderlichen Proteinmengen gearbeitet werden. Außerdem müssen z.B. die Proteindegradation und post-translationale Proteinmodifikation berücksichtigt werden. Durch die Vielzahl an vorhandenen Proteinen (20000-25000 Gene wurden alleine für den Menschen identifiziert) ergeben sich unzählige mögliche Wechselwirkungen untereinander oder mit kleinen Molekülen. Es ist daher enorm wichtig zu verstehen, (i) wo ein bestimmtes Protein lokalisiert ist, (ii) unter welchen Bedingungen es mit anderen Interaktionspartnern wechselwirkt, (iii) was durch die Interaktion ausgelöst wird, (iv) welche spezifische Funktion das Protein hat und (v) wie es strukturell aufgebaut ist. Es gibt verschiedene Ansätze, einzelne Proteine und ihre Wechselwirkungen zu charakterisieren, wobei meist erst eine Kombination verschiedener Methoden zum Erfolg führt<sup>3-7</sup>. In **Tabelle 1** sind die wichtigsten experimentellen Methoden und mögliche Anwendungsgebiete zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Für die Proteomik verwendete Methoden und ihre wichtigsten Anwendungsgebiete.

Methoden	Fragestellung	
Massenspektrometrie	Proteinidentifikation	<i>in vitro</i>
Röntgen-Kristallographie	Struktur <sup>a</sup> , Gestalt, Symmetrie, Stöchiometrien <sup>b</sup>	<i>in vitro</i>
Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)	Struktur <sup>a</sup> , Stöchiometrien <sup>b</sup>	<i>in vitro</i>
Elektronenmikroskopie (Einzelmolekülanalyse)	Struktur <sup>a</sup> , Gestalt, Symmetrie	<i>in vitro</i>
Elektronentomographie	Lokalisation, Struktur <sup>a</sup> , Gestalt, Symmetrie	<i>in vitro</i>
Immuno-Elektronenmikroskopie	Lokalisation, Symmetrie	<i>in vitro</i>
Quervernetzung	Struktur <sup>c</sup> , Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup>	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>
Affinitäts-Reinigung	Struktur <sup>c</sup> , Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup>	<i>in vitro</i>
FRET	Struktur <sup>c</sup> , Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup> , Konformationsänderungen	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>
ortsgerichtete Mutagenese	Struktur <sup>c</sup> , Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup>	<i>in vivo</i>
<i>Yeast two-hybrid system</i>	Struktur <sup>c</sup> , Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup>	<i>in vivo</i>
Gen/Protein Arrays	Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup>	<i>in vitro</i>
Fluoreszenzmikroskopie	Lokalisation, Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup> , Struktur <sup>c</sup>	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>
Fluoreszenzspektroskopie	Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup> , Konformationsänderungen	<i>in vitro</i>
2D-Gelelektrophorese	Proteinidentifikation, Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup>	<i>in vitro</i>
Festphasenmethoden	Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup> , Struktur <sup>c</sup>	<i>in vitro</i>
<i>Chromophore-Assisted Laser Inactivation (CALI)</i>	Proteinwechselwirkungen <sup>d</sup>	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>

<sup>a</sup>) Es kann sich sowohl um die Struktur eines einzelnen Proteins, eines Proteinkomplexes als auch einer Untereinheit handeln. <sup>b</sup>) Es sind sowohl Stöchiometrien von Untereinheiten als auch mit Liganden eingeschlossen. <sup>c</sup>) Hier handelt es sich um die Struktur im Sinne von Kontaktstellen, Bindungsstellen, etc. <sup>d</sup>) Protein/Protein-, Protein/DNA-, Protein/Peptid-, Protein/RNA- und Proteinwechselwirkungen mit kleinen Molekülen sind eingeschlossen. Die Bezeichnungen sind unabhängig von den mit der Methode bestimmten Parametern. Methoden, die eine Markierung des Proteins erfordern sind rot gekennzeichnet, die die eine Immobilisierung erfordern blau.

Bei einer Vielzahl der hier aufgezählten Methoden ist eine Markierung des Proteins mit einem geeigneten Reporter (**Tabelle 1**; rot) oder die Immobilisierung des Proteins (blau) nötig, damit eine Detektion stattfinden kann. Aus diesem Grund spielt die Modifikationen von Proteinen für deren genaue Untersuchung eine entscheidende Rolle. In den folgenden Abschnitten werden die Proteinmodifikation in Lösung und die Proteinimmobilisierung an Oberflächen genauer beschrieben.

## I.1 Proteinmodifikationen in Lösung

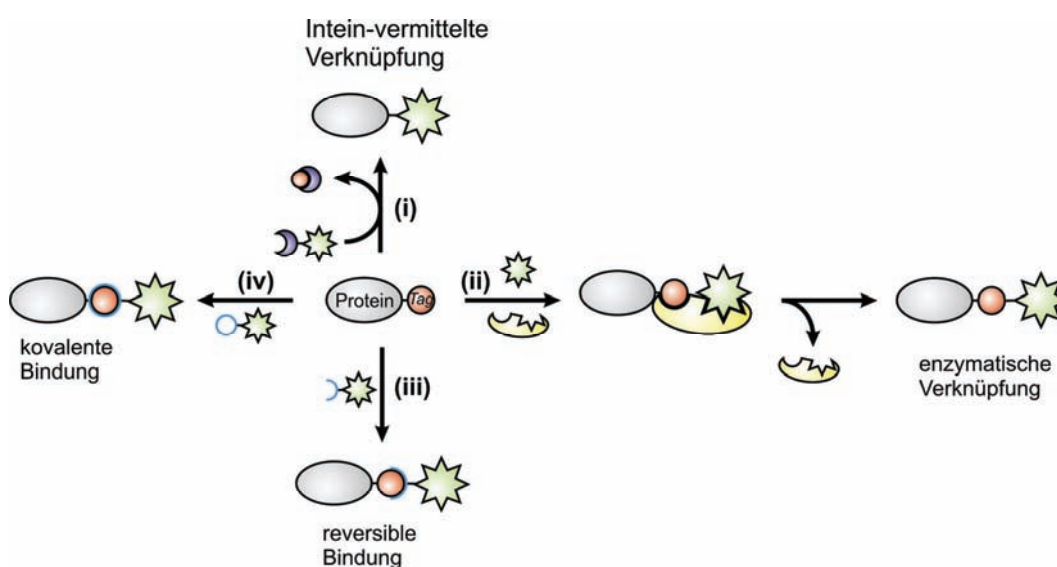
Die Modifikation von Proteinen mit geeigneten Reportersonden, wie z.B. Fluorophoren, Goldclustern oder radioaktiven Sonden, kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden. Bei der Modifikation muss zum einen beachtet werden, dass sie einheitlich ist, damit homogene Proteinproben vorliegen. Nur so kann garantiert werden, dass alle Proteine das gleiche Verhalten zeigen. Zum anderen darf die biologische Funktion des Proteins durch die Modifikation selbst oder die Reaktion während der Modifikation nicht beeinflusst werden. Es ist außerdem wichtig, dass sie spezifisch, d.h. gezielt, durchgeführt werden kann<sup>8,9</sup>. Aus diesen Gründen gibt es eine Vielzahl verschiedener Strategien, die für die Proteinmodifikation verfolgt werden.

Besonders die fluoreszenzbasierenden Methoden haben in den letzten Jahren deutlich an Potential für die Untersuchung biologischer Systeme gewonnen. Daher kommt der Markierung von Proteinen mit Fluorophoren eine besondere Bedeutung zu. Sie ist z.B. unerlässlich, um die Lokalisation, Bewegung oder Wechselwirkung eines Proteins durch Fluoreszenzmikroskopie oder -spektroskopie zu untersuchen<sup>10-12</sup>. Eine Sonderstellung bei der Markierung mit fluoreszenten Sonden nehmen die autofluoreszenten Proteine (AFPs, *autofluorescent proteins*) ein. Die Arbeiten auf dem grünfluoreszierenden Protein (GFP, *green fluorescent protein*) aus *Aequorea victoria* wurden 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt<sup>13-15</sup>. Inzwischen sind verschiedenste AFPs mit verbesserten fluoreszenten Eigenschaften generiert worden<sup>16,17</sup>, welche ein breites Wellenlängenspektrum abdecken und bevorzugt in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. Auch durch Licht einer bestimmten Wellenlänge schaltbare AFPs sind inzwischen bekannt und im Einsatz<sup>18,19</sup>. AFPs werden genetisch an das zu untersuchende Protein angebracht und so mit ihm synthetisiert. Dabei kann es, aufgrund der Größe des AFPs (238 Aminosäuren für GFP), zu einer ungewollten Beeinflussung des eigentlich interessierenden Proteins kommen.



Durch die genetische Modifikation der Proteine sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien möglich, wobei die *in vivo* Anwendungen weit überlegen sind. Bei den *in vivo* Studien gilt es allerdings zu beachten, dass die Überexpression eines Proteins drastische Änderungen zellulärer Prozesse und damit des Proteoms mit sich bringen kann.

Für *in vitro* Studien werden meist, aufgrund der geringeren Größe und den besseren spektralen Eigenschaften, chemische Fluorophore benutzt. Die direkte *in vitro* Markierung von isolierten Proteinen mit chemischen Fluorophoren wird oftmals über funktionelle Amino- oder Thiolgruppen durchgeführt<sup>20,21</sup>. Dazu werden *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester)- bzw. Maleimid- oder Iodacetamid-Derivate des jeweiligen Fluorophors eingesetzt. Aminogruppen sind in hoher Anzahl in Proteinen enthalten, wodurch eine einheitliche Markierung mittels NHS-Ester kaum möglich ist. Die Bestimmung des Markierungsgrades liefert hier nur Durchschnittswerte, weil er von Protein zu Protein variieren kann. Besser ist die spezifische Markierung von Cysteinen, da diese oftmals nicht oder nur in geringer Zahl in Proteinen vorkommen. Durch eine ortsspezifische Mutagenese können einzelne Cysteine (*single cysteines*) in das Protein eingeführt werden können. Anschließend können diese mit einem geeigneten Fluorophor selektiv umgesetzt werden. Bei Cysteinen, die für die Struktur bzw. die Funktion des Proteins essentiell sind, kann eine solche Markierung jedoch nicht durchgeführt werden.

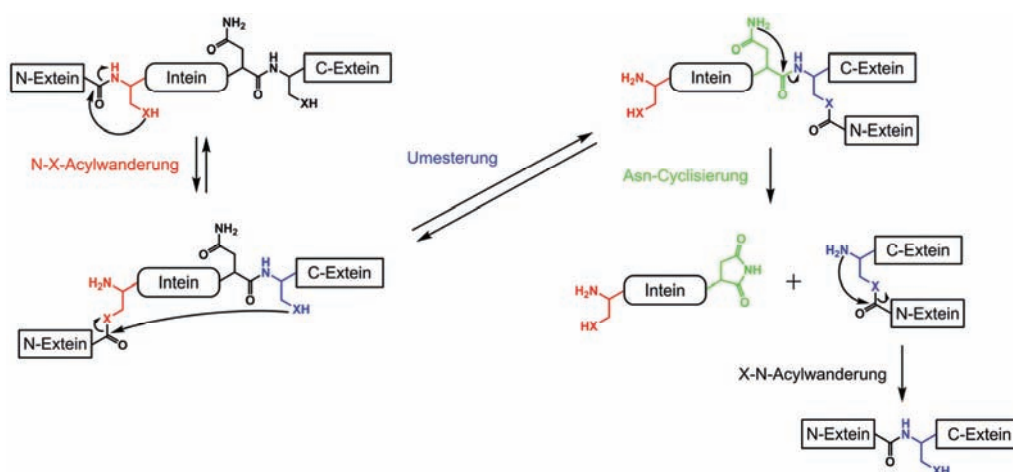


**Schema 1:** Schematische Darstellung der besprochenen Methoden für die Tag-vermittelte Proteinmodifikation. Es werden vier große Klassen unterschieden: (i) die Intein-vermittelten Modifikationen, (ii) die enzymatischen Verknüpfungen, (iii) die Bildung einer kovalenten Bindung und (iv) die Bildung einer reversiblen Verknüpfung.

Die am häufigsten und am erfolgreichsten eingesetzten Methoden zur Modifikation von Proteinen beruhen allerdings auf mit *Tags* ausgestatteten Fusionsproteinen (**Schema 1**)<sup>22</sup>. Bei den genetisch codierten *Tags* kann es sich um ein komplettes Protein oder eine kurze, definierte Aminosäuresequenz handeln. Die gewünschten Sonden werden dann so modifiziert, dass sie spezifisch post-translational mit diesem *Tag* wechselwirken. Dabei können sowohl kovalente, als auch nicht-kovalente Bindungen entstehen. Wie beim GFP gilt, dass die Funktion des Proteins durch die angehängte Sonde nicht beeinflusst werden darf. Zusätzlich sollte die Ankopplung auch keinen negativen Einfluss auf die benutzte Sonde haben. Im Hinblick auf die Funktion des Fusionsproteins ist daher ein kurzer *Tag* immer die bessere Alternative. Allerdings ist, wenn gefaltete, funktionale Proteine als *Tag* eingesetzt werden, die spezifische Wechselwirkung mit einem Liganden meistens höher. Die am häufigsten angewendeten Methoden für die *Tag*-vermittelte Modifikation von Fusionsproteinen werden im Folgenden genauer vorgestellt. Für weitere Beispiele wird auf hervorragende Reviews verwiesen<sup>8,22-24</sup>.

### I.1.1 Protein-Spleißen mit Inteinen

Unter Inteinen versteht man interne Polypeptidsequenzen, die sich autokatalytisch aus einem Protein ausschneiden und die übrigen Teile (Exteine) durch eine Peptidbindung miteinander verknüpfen<sup>25</sup>.



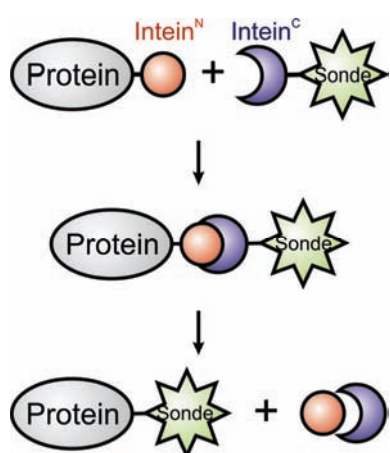
**Schema 2:** Mechanismus des Protein-Spleißens. Es werden vier Teilschritte durchlaufen: (i) N-X-Acylwanderung, (ii) Umesterung, (iii) Asn-Cyclisierung und (iv) X-N-Wanderung. Mögliche Nebenreaktionen sind nicht dargestellt. Anstelle von Ser kann auch ein Cys oder Thr vorhanden sein. X = S, O. In Anlehnung an NOREN et al.<sup>25</sup>.

Für einen erfolgreichen Ablauf der Reaktion muss das Intein lediglich richtig gefaltet sein. Allen bereits identifizierten Inteinen gemein sind ein Serin oder Cystein an der *N*-terminalen und eine Triade aus Histidin-Asparagin/Glutamin-Serin/Threonin/Cystein an der *C*-terminalen Schnittstelle. Der Mechanismus des Protein-Spleißens verläuft über vier gekoppelte nukleophile Substitutionen<sup>25</sup>. Zunächst findet eine N-X-Acylverschiebung (X = O, S) am Serin bzw. Cystein statt (**Schema 2**; rot). Im zweiten Schritt wird durch eine Umesterung ein verzweigtes Zwischenprodukt gebildet (**Schema 2**; blau). Anschließend erfolgt die Freisetzung des Inteins durch eine Cyclisierung des Asparagins/Glutamins (**Schema 2**; grün). Im letzten Schritt wird durch eine X-N-Acylverschiebung (X = O, S) eine native Peptidbindung zwischen den beiden Exteinen gebildet (**Schema 2**; schwarz).

Inteine wurden benutzt, um Proteine zu reinigen<sup>26,27</sup>, mit Fluorophoren zu modifizieren<sup>28-30</sup>, semisynthetisch herzustellen<sup>31,32</sup> und segmentweise für die NMR-Spektroskopie zu markieren<sup>31,33</sup>. Außerdem wurden sie zur Expression cytotoxischer Proteine eingesetzt werden<sup>34</sup>.

### I.1.1.1 Protein-Spleißen in *trans*

Das sogenannte Protein-Spleißen in *trans* stellt eine Sonderform des Protein-Spleißens dar, bei dem gesplante Inteine (*split inteins*) eingesetzt werden (**Schema 3**)<sup>31,35-37</sup>.



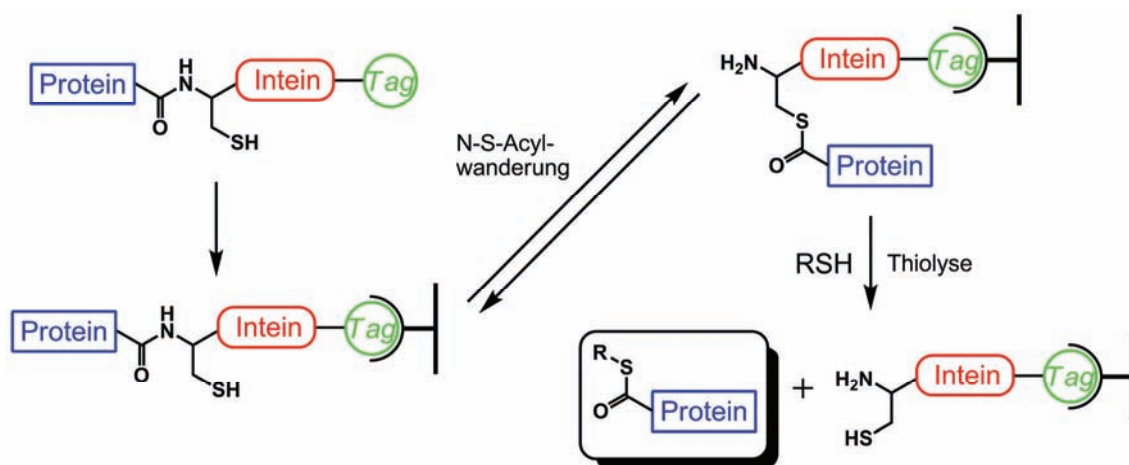
**Schema 3:** Schematische Darstellung des Protein-Spleißens in *trans*. Das Intein ist in zwei Fragmente (Intein<sup>N</sup>, Intein<sup>C</sup>) geteilt, die unterschiedlich groß sein können. Nach Assoziation der beiden Inteinfragmente werden die beiden Exteinfragmente über eine Peptidbindung verknüpft. Das gesplante Intein wird dabei freigesetzt.

Es eignet es sich besonders gut, um Sonden in ein Protein einzuführen. Das zu untersuchende Protein wird rekombinant mit einem Teil eines Inteins exprimiert. Der zweite Teil des gesplanten Inteins kann sich ebenfalls an einem anderen Protein, Peptid

oder einer chemischen Sonde befinden. Durch die Assoziation des Intein<sup>N</sup>-Fragments mit dem Intein<sup>C</sup>-Fragment wird ein aktives Intein rekonstituiert, welches die zwei Exteinsequenzen miteinander verknüpft. Intein<sup>C</sup>-Fragmente, die nur 11 Aminosäuren lang und damit synthetisch gut zugänglich sind, wurden mit Fluorophoren markiert für die Herstellung fluoreszenter Proteine benutzt<sup>28</sup>.

### I.1.1.2 Intein-vermittelte Proteinverknüpfung

Die Intein-vermittelte Proteinverknüpfung (EPL, *expressed protein ligation*) wurde entwickelt, um Proteine semisynthetisch herzustellen<sup>29,38,39</sup>. Dabei wird über ein Intein ein C-terminaler Thioester in ein Protein eingeführt, der für eine anschließende chemische Ligation verwendet werden kann (**Schema 4**). Das zu untersuchende Protein wird dazu als *N*-Extein an ein mutiertes Intein, welches sich nicht selbst autokatalytisch herauschneiden kann, fusioniert. Als *C*-Extein dient ein Affinitäts-Tag, der durch ein entsprechendes Säulenmaterial gebunden werden kann. Durch die Zugabe eines kleinen Thiols wird das Protein als Thioester freigesetzt, während das Intein über den Affinitäts-Tag gebunden auf dem Säulenmaterial zurückbleibt.



**Schema 4:** Schematische Darstellung der *expressed protein ligation* (EPL). Das zu untersuchende Protein (blau) wird als Fusionsprotein mit einem Intein (rot), welches sich nicht selbst herauschneiden kann und einen Affinitäts-Tag trägt (grün), exprimiert. Nach dem Binden an das Säulenmaterial findet eine N-S-Acylwanderung statt. Durch Zugabe eines kurzen Thiols kann das gewünschte Protein als Thioester freigesetzt werden. Das gereinigte Protein kann durch Hydrolyse des Thioesters erhalten werden. Die Umsetzung mit einer synthetischen Komponente mittels nativer chemischer Ligation führt zu einem modifizierten Protein.

Durch eine anschließende native chemische Ligation kann das Protein mit einem anderen Protein oder Peptid fusioniert werden<sup>40,41</sup>. Auch die semisynthetische Synthese von phosphorylierten<sup>42</sup>, glycosylierten<sup>43,44</sup> sowie Isotopen-<sup>45,46</sup> und fluoreszenzmarkierten<sup>30,47,48</sup> Proteinen wurde auf diese Weise durchgeführt.

### I.1.2 Enzymatische Modifikationen

Bei den enzymvermittelten post-translationalen Modifikationen von Fusionsproteinen wird der *Tag* als spezifische Erkennungssequenz für ein Enzym verwendet. Im Idealfall ist die Erkennungssequenz in keinem der anderen möglicherweise anwesenden Proteine vorhanden. Außerdem sollte das modifizierte Substrat, welches für die Ligation benutzt werden soll und die anzubringende Sonde trägt, nicht von anderen Enzymen erkannt werden. Die Sonde muss dabei eine Erkennung durch das richtige Enzym zulassen. Proteinsubstrate als *Tag* garantieren eine schnelle und spezifische Markierung durch das entsprechende Enzym. Oftmals sind aber auch aus dem ursprünglichen Protein Polypeptide generiert worden, die von dem jeweiligen Enzym mit der gleichen Spezifität als Substrat genutzt werden können.

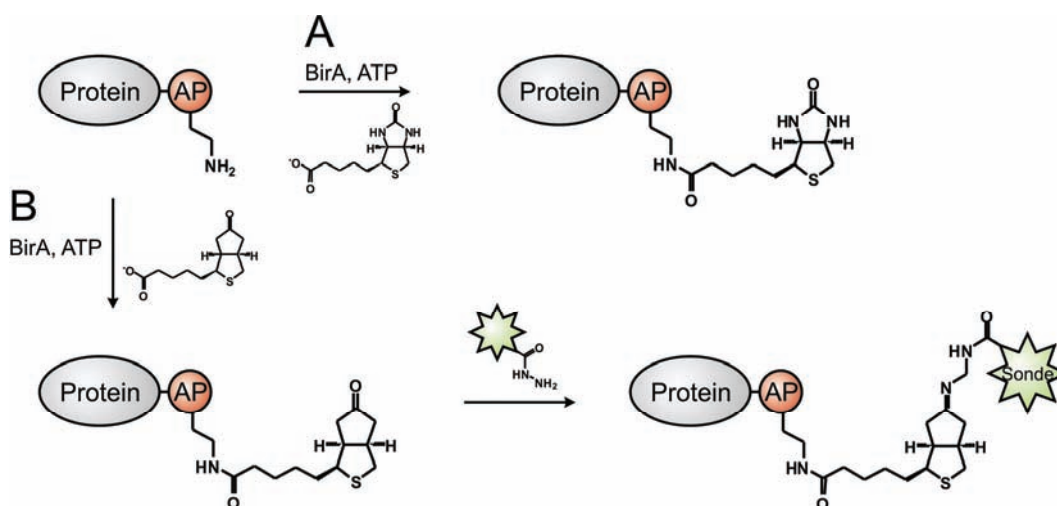
In diesem Feld gibt es eine Vielzahl von Enzymen, die *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden können. Es werden daher hier nur die wichtigsten Beispiele kurz vorgestellt und ansonsten auf Reviews verwiesen<sup>8,22,23</sup>.

#### I.1.2.1 Biotin-Ligase BirA

Lange Zeit war das einzige auch *in vivo* vernünftig einsetzbare System die Biotinylierung von Biotin-Acceptor-Domänen durch die Biotin-Ligase BirA aus *E. coli*<sup>49,50</sup> (**Schema 5 A**). Dabei wird das Biotin auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysins übertragen, welches sich in einer Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP)-Untereinheit befindet. Von BECKETT et al. wurde aus dem BCCP ein nur 14 Aminosäuren langer *Tag* (GLNDIFEAQKIEWH, AP-*Tag*) entwickelt, dessen Lysin spezifisch von BirA biotinyliert wird<sup>51</sup>. Bei *in vitro* Studien und an Zelloberflächen konnten die biotinylierten Proteine anschließend mit einem (Strept)Avidin-Derivat weiter modifiziert werden<sup>52</sup>.

Eine direkte Modifikation mit einem anderen Substrat als Biotin war lange Zeit nicht möglich. 2005 stellen CHEN et al. vor, dass BirA nicht nur Biotin sondern auch das

isostere Keton als Substrat erkennt und auf einen kurzen *Tag* überträgt<sup>53</sup>. Die Ketofunktion hat den Vorteil, dass sie durch Umsetzung mit Hydraziden leicht modifiziert werden kann (**Schema 5 B**), wodurch das Einführen verschiedenster Sonden ermöglicht wird. Die Methode wurde erfolgreich für die spezifische Fluoreszenzmarkierung von isolierten Proteinen sowie von Proteinen in Zelllysaten und an Zelloberflächen eingesetzt. Nachteile der Methode sind die langsame Umsetzung des Hydrazids und die mögliche Hydrolyse des entstehenden Hydrazons.

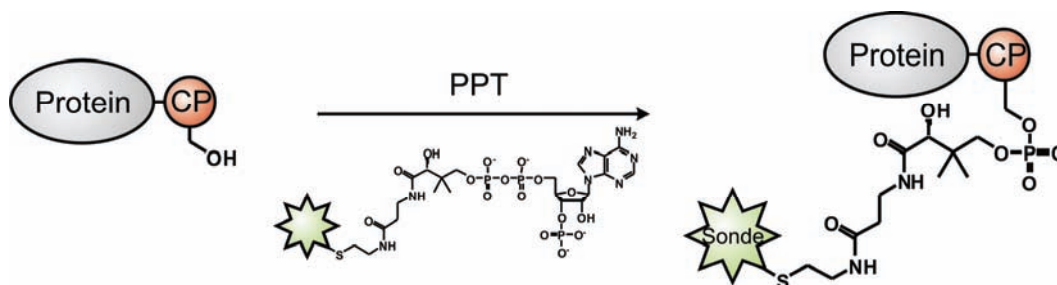


**Schema 5:** Modifikation eines AP-Fusionsproteins mittels BirA. **(A)** Biotinylierung eines Proteins. **(B)** Modifizierung eines AP-getaggten Proteins mit einem Ketoderivat von Biotin und anschließende Markierung durch ein Hydrazid-Derivat. In Anlehnung an GRONEMEYER et al.<sup>23</sup>.

### I.1.2.2 Phosphopantetheinyl-Transferasen

Die Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTs) übertragen das Phosphopantetheinyl von Coenzym A (CoA) auf einen konservierten Serinrest in einem Acyl- (ACP) oder Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) (**Schema 6**). Ein Vorteil der PPTs ist, dass sie viele Modifikationen am endständigen Thiol des CoAs erlauben. Dadurch ist es gelungen, Proteine in der Zellmembran mit Fluorophoren, Digoxigenin und Biotin<sup>54</sup> zu markieren. Mit auf diese Weise fluoreszenzmarkierten ACP-Neurokinin-1 Rezeptoren wurden Einzelmolekülstudien<sup>55</sup> und FRET-Messungen<sup>56,57</sup> durchgeführt.

Auch wenn ACP und PCP mit 77-120 Aminosäureresten als relativ kleine *Tags* angesehen werden können, sind doch Versuche unternommen worden, die *Tag*-Länge zu reduzieren. Das erste dieser Peptidsubstrate war der *ybbR-Tag* (DSLEFIASKLA), der spezifisch für die PCP-Synthase Sfp ist und aus nur 11 Aminosäuren besteht<sup>58</sup>.



**Schema 6:** Modifizierung eines Carrier-Protein (CP)-Fusionsproteins mit einem Coenzym A (CoA)-Derivat durch eine Phosphopantetheinyl-Transferase (PPT). In Anlehnung an GRONEMEYER et al.<sup>23</sup>.

Zwei weitere *Tags*, die orthogonal von Sfp und der ACP-Synthase (AcpS) markiert werden können, wurden 2007 von ZHOU et al. vorgestellt<sup>59</sup>. Die *Tags* bestehen aus jeweils 12 Aminosäuren (Sfp: GDSLSWLLRLLN, AcpS: GDSLDMLEWSLM) und wurden zur orthogonalen Markierung von zwei unterschiedlichen Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit zwei verschiedenen Fluorophoren benutzt. Aus derselben Gruppe wurde kürzlich ein nur 8 Aminosäuren langer *Tag* (DSLDMLEW) vorgestellt, der sowohl terminal als auch in Loopregionen mittels AcpS modifiziert werden kann<sup>60</sup>.

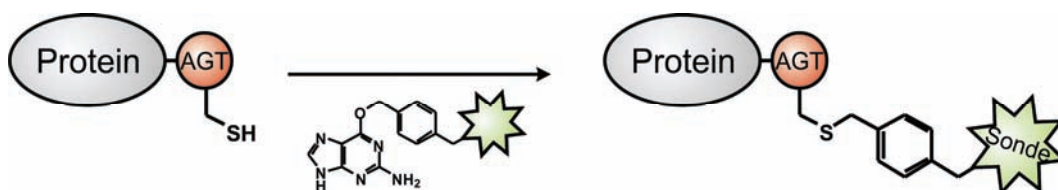
### I.1.3 Kovalente Selbst-Modifikationen

Bei den Selbst-Modifikationen wird kein Enzym benutzt, um *Tag* und Substrat zu verknüpfen, sondern der *Tag* selbst löst die Bindungsreaktion aus. Diese Strategie hat den großen Vorteil, dass kein aktives Enzym zur Verfügung stehen muss.

#### I.1.3.1 hAGT-*Tag*

Die humane *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (hAGT) repariert DNA, indem sie die Alkylgruppe ihres Substrates, *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA, irreversibel auf eine Thiolgruppe der eigenen Cysteine überträgt. Allerdings ist die Substratspezifität nicht besonders hoch und es wird z.B. auch *O*<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG) erkannt (**Schema 7**). Über modifizierte BG-Derivate lassen sich so hAGT-Fusionsproteine spezifisch markieren. Durch gezielte Mutationen wurden hAGTs generiert, die eine erhöhte Aktivität für BG zeigen<sup>61</sup>. KEPPLER et al. demonstrierten, dass das hAGT/BG-System genutzt werden kann, um Proteine nicht nur auf der Zelloberfläche sondern auch im Zellinneren zu modifizieren<sup>62</sup>.

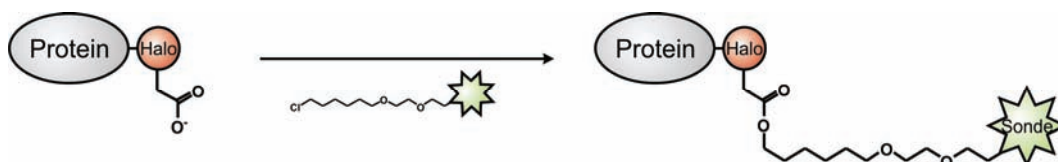
Aus dem hAGT wurde der sogenannte *SNAP-Tag* entwickelt, der nur wenig kleiner ist, dafür aber schneller reagiert, stabiler gegen Oxidation ist und nicht an DNA bindet<sup>63,64</sup>. Die Markierung von endogenem humanem AGT kann durch die Verwendung des *SNAP-Tags* und spezifische Inhibitoren verhindert werden. Die Möglichkeit, mit diesem System zwei Proteine orthogonal zu modifizieren, wurde durch eine Mutation des hAGTs geschaffen. Das Einbringen eines Loops ändert die Substratspezifität so, dass auch *O*<sup>6</sup>-Propargylguanin erkannt wird. Durch sukzessive Umsetzung beider *Tags* mit entsprechend modifizierten Fluorophoren konnten zwei Proteine mit verschiedenen Farben markiert werden<sup>65</sup>.



**Schema 7:** Selbst-Modifikation eines *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (hAGT)- oder *SNAP-Tag*-Fusionsproteins mit einem *O*<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG)-Derivat. In Anlehnung an GRONEMEYER et al.<sup>23</sup>.

### I.1.3.2 Halo-Tag

Beim *Halo-Tag* handelt es sich um eine mutierte Halogenalkan-Dehalogenase (Halo), die spezifisch eine Halogen-Kohlenstoff-Bindung spalten kann (**Schema 8**). Dabei wird der aliphatische Rest auf die Dehalogenase übertragen. Die Mutation verhindert, dass der entstehende Ester hydrolysiert wird. Die Methode wurde sowohl in Säugetierzellen<sup>66,67</sup> als auch in Pflanzenzellen<sup>68</sup> für die Fluoreszenzmarkierung angewendet. Neben Fluorophoren wurden auch *Quantum dots* verwendet<sup>69,70</sup>. Mit etwa 293 Aminosäuren stellt die Dehalogenase allerdings einen sehr großen *Tag* dar.



**Schema 8:** Selbst-Modifikation eines *Halo-Tag*-Fusionsproteins mit einem derivatisierten Chlor-Kohlenwasserstoff. In Anlehnung an GRONEMEYER et al.<sup>23</sup>.



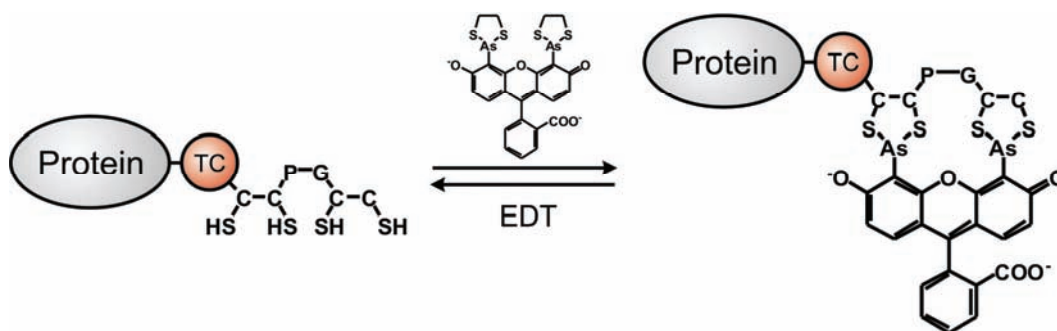
### I.1.4 Reversible Modifikationen

Die Reversibilität einer Modifikation kann von großem Nutzen sein, wenn z.B. eine Markierung oder Immobilisierung rückgängig gemacht werden soll. Dabei ist darauf zu achten, dass die ausgebildete Wechselwirkung stark genug ist, um eine über lange Zeit stabile Bindung erzeugen zu können.

#### I.1.4.1 Tetracystein-Tag

Der wohl bekannteste *Tag* für die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen ist der Tetracystein (TC)-*Tag*<sup>71</sup>, der spezifisch und mit hoher Affinität ( $K_D = 2-70 \text{ pM}^{72}$ ) Biarsen-Farbstoffe wie FIAsh (grün), ReAsH (rot) und CHOxAsH (blau) oder in Hinblick auf ihr spektrales Verhalten verbesserte Farbstoffe bindet<sup>71-75</sup> (**Schema 9**).

Der *Tag* muss vier Cysteine besitzen, von denen jeweils zwei benachbarte in der Lage sein müssen, ein  $\text{As}^{3+}$  zu komplexieren. Damit kann der *Tag* minimal aus sechs Aminosäuren (CCXXCC; X = beliebige Aminosäure außer Cystein; höchste Affinitäten für PG<sup>72</sup>) bestehen, was einen entscheidenden Größenvorteil mit sich bringt. Aufgrund der geringen Größe ist nicht nur eine N- oder C-terminale Fusion, sondern auch die Inkorporation in Loopregionen oder  $\alpha$ -Helices möglich.



**Schema 9:** Bindung eines Biarsen-Farbstoffes (FIAsh) an ein Tetracystein (TC)-Fusionsprotein. Die Bindung ist durch Zugabe von Ethandithiol (EDT) reversibel. In Anlehnung an GRONEMEYER et al.<sup>23</sup>.

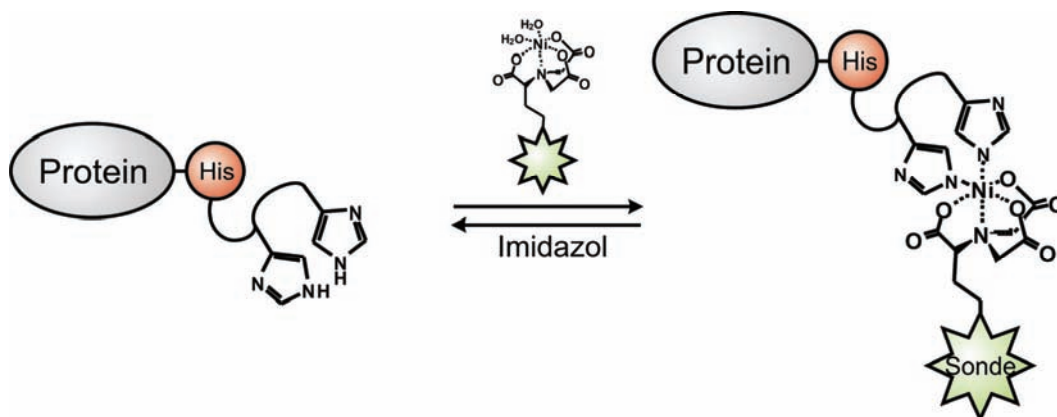
Weitere Vorteile der Methode sind, dass sie, aufgrund der membrangängigen Farbstoffe, *in vivo* angewendet werden kann und dass die Fluorophore bis zum Binden an den TC-*Tag* teilweise gequencht sind. Dadurch wird das Hintergrundsignal, das durch ungebundene Fluorophore entsteht, relativ gering gehalten. Ein Nachteil der Methode ist, dass unter reduktiven Bedingungen in Anwesenheit von 1,2-Ethandithiol (EDT) gearbeitet werden muss. Mit hohen (millimolaren) Konzentrationen an EDT

kann der Fluorophor wieder vom *Tag* entfernt werden, während er unter physiologischen Bedingungen über Tage konstant gebunden bleibt. Einen weiteren Nachteil stellt die unspezifische Bindung der Farbstoffe dar. Aus diesem Grund entwickelten TSIEN et al. einen *Tag* (FLNCCPGCCMEP), der durch bestimmte flankierende Aminosäuren eine höhere Affinität und Spezifität für ReAsH aufweist<sup>76</sup>. Die Fluoreszenzmarkierung des TC-*Tags* mit unterschiedlichsten Farbstoffen wurde eingesetzt, um Konformationsänderungen mittels FRET<sup>77,78</sup> zu verfolgen oder um die Lokalisation<sup>79</sup> und/oder Strukturierung<sup>80,81</sup> bestimmter Proteine zu untersuchen. Erwähnenswert ist außerdem, dass ReAsH eine reaktive Sauerstoffspezies generiert, wodurch (i) das gezielte Ausschalten markierter Proteine mittels Chromophor-unterstützter-Licht-Inaktivierung (CALI, *chromophor assisted light inactivation*)<sup>82</sup> durchgeführt werden konnte<sup>83</sup> und (ii) ein spezifisches Anfärben für die Elektronenmikroskopie ermöglicht wurde<sup>74,79</sup>.

#### I.1.4.2 Histidin-*Tag*

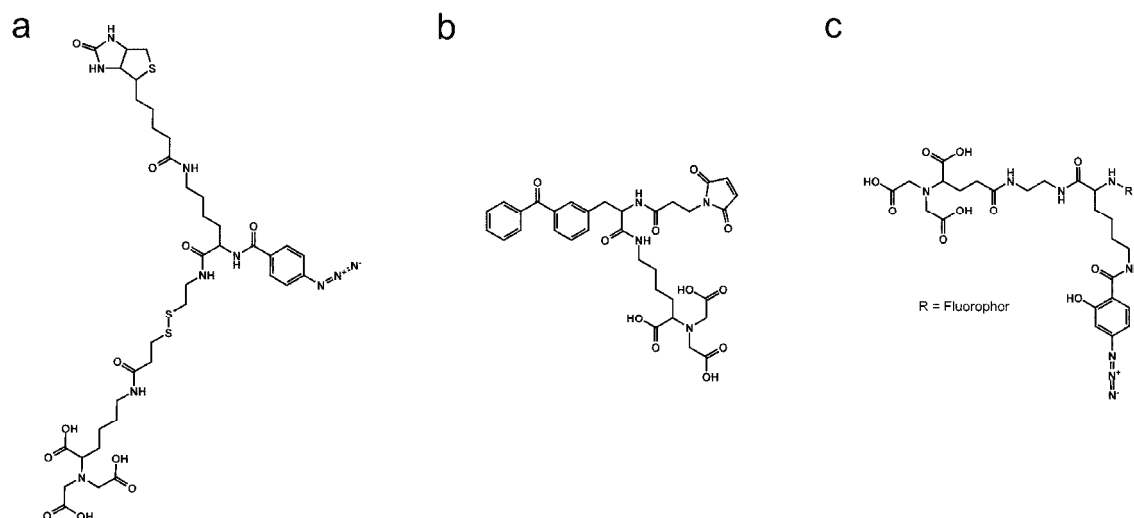
Der Histidin (His)-*Tag* ist der in der Biochemie am häufigsten verwendete *Tag*, weil er oftmals erfolgreich für die Reinigung von Proteinen eingesetzt wird<sup>84,85</sup>. In der Regel besteht ein His-*Tag* aus 6-10 aufeinanderfolgenden Histidinen. Oligohistidine bilden bei nahezu neutralem pH mit zweiwertigen Übergangsmetallionen wie Ni<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup> stabile Komplexe, die durch Imidazol, Histidin, EDTA oder einen sauren pH gelöst werden können.

Durch die Verwendung modifizierter Chelatoren, die zweiwertige Ionen teilweise komplexieren, kann ein Chelator/His-*Tag*-Komplex gebildet werden, der den modifizierten Chelator reversibel an das Fusionsprotein bindet. Als Chelator in Lösung wird hauptsächlich *N*-Nitrilotriessigsäure (NTA) verwendet, welches vier Bindungsstellen des Ions komplexiert und zwei für die Bindung von Histidinen unbesetzt lässt (**Schema 10**).



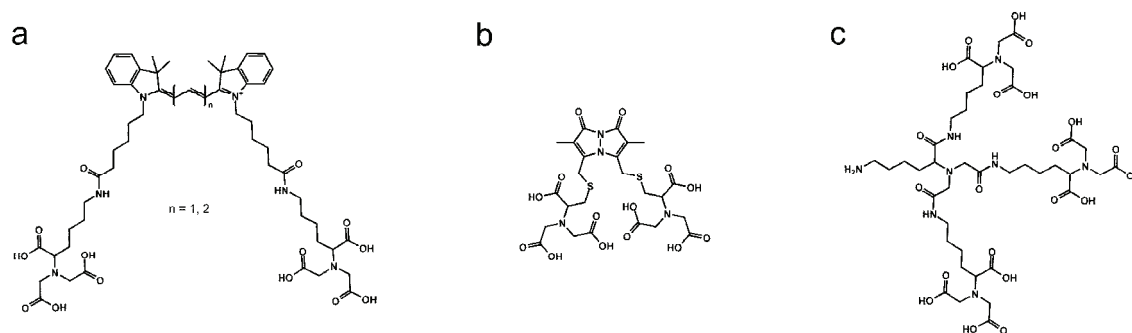
**Schema 10:** Modifikation eines Oligohistidin (His)-Fusionsprotein mit einem *N*-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Derivat. Die Bindung ist durch Zugabe von Imidazol, Histidin oder EDTA reversibel.

MEREDITH et al. synthetisierten trifunktionale Moleküle, die über (i) ein *monoNTA*, (ii) eine photoreaktive Azidfunktionalität oder ein Benzophenon und (iii) ein Biotin oder ein Maleimid verfügen (**Abb. 1 a, b**)<sup>86</sup>. Durch das *monoNTA* koordiniert das Molekül an einen His-Tag, und eine anschließende Belichtung führt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung in der Nähe des Tags. Über das Biotin oder Maleimid konnten neue Funktionalitäten wie (Strept)Avidin oder Oligonukleotide eingeführt werden. Außerdem wurde das System für den Aufbau von Proteinarrays verwendet. Ein paar Jahre später nutzen HINTERSTEINER et al. dasselbe Prinzip, um Proteine auf Zelloberflächen kovalent mit Fluorophoren zu markieren (**Abb. 1 c**)<sup>87</sup>.



**Abb. 1:** Trifunktionale Moleküle mit einem *monoNTA*, die mittels Belichtung kovalente Bindungen ausbilden. **(a)** und **(b)** von MEREDITH et al.<sup>86</sup>, **(c)** von HINTERSTEINER et al.<sup>87</sup>.

Fluoreszente NTA-Chelatoren wurden vielfach für die Markierung *His-getaggtter* Proteine *in vitro* und *in vivo* eingesetzt<sup>88-91</sup>. Dabei stellte sich heraus, dass eine stabile Markierung aufgrund der niedrigen Affinität einer einzelnen NTA-Gruppe für einen *His<sub>6</sub>-Tag* (*monoNTA*,  $K_D \approx 10 \mu\text{M}$ ) kaum möglich ist<sup>88,89</sup>. Um die Affinität zu steigern modifizierten KAPANIDIS et al. einen Cy3- und Cy5-Fluorophor symmetrisch so, dass er mit zwei NTA-Gruppen ausgestattet war (**Abb. 2 a**). Die Dissoziationskonstante wurde dadurch für einen *His<sub>6</sub>-Tag* auf  $K_D \approx 0.9 \mu\text{M}$  reduziert<sup>88</sup>. Eine einfache Strategie, ein bivalentes, fluoreszierendes NTA-Derivat zu synthetisieren wurde 2007 von KRISHNAN et al. vorgestellt. Die Synthese ergibt ein relativ starres Molekül mit einem Biman-Derivat als Fluorophor (**Abb. 2 b**). Mit einem  $K_D$  von ungefähr  $5 \mu\text{M}$  für einen *His<sub>10</sub>-Tag* liegt die Affinität allerdings deutlich über der der modifizierten Cy-Farbstoffe<sup>92</sup>. Auch wenn die NTA-Cy-Farbstoffe relativ gute Affinitäten aufzeigen, so haben beide Strategien doch das Problem, dass der Fluorophor nicht einfach gegen einen anderen Farbstoff oder eine beliebige Reportersonde ausgetauscht werden kann.

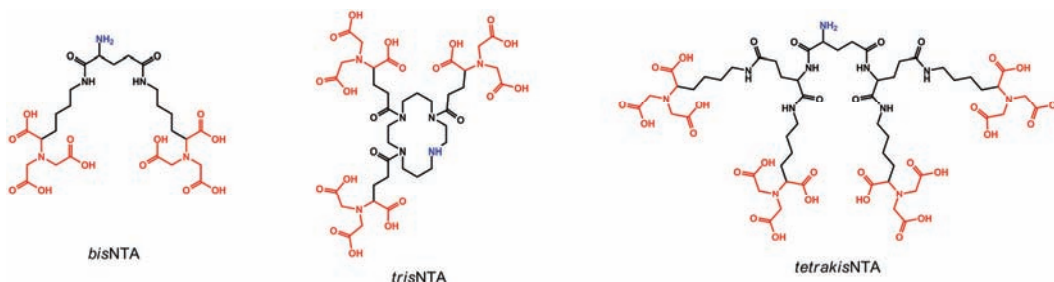


**Abb. 2:** Strukturen multivalenter NTA-Moleküle. **(a)** Mit zwei NTA-Gruppen modifizierter Cy3- oder Cy5-Farbstoff von KAPANIDIS et al.<sup>88</sup>. **(b)** Bivalentes NTA-Derivat mit Biman-Einheit als Fluorophor von KRISHNAN et al.<sup>92</sup>. **(c)** Trivalentes NTA-Molekül von HUANG et al.<sup>93</sup>, das über das Amin modifiziert werden kann.

Eine systematische Untersuchung, welchen Einfluss die Anzahl der NTA-Gruppen auf die Affinität für einen gegebenen *His-Tag* in Lösung hat, wurde erstmals von LATA et al. durchgeführt<sup>94</sup>. Die Synthese von multivalenten Chelatorköpfen (MCH, *multivalent chelator heads*) mit zwei, drei und vier NTA-Gruppen (*bis-*, *tris-*, *tetrakisNTA*) hat gezeigt, dass die Affinität bis in den nanomolaren Bereich erhöht werden kann (**Abb. 3, Tabelle 2**).

Durch die gesteigerten Affinitäten wurde eine spezifische, stabile, stöchiometrische und reversible Markierung von *His-getaggtten* Proteinen mit Fluorophoren ermöglicht<sup>94</sup>.

Besonders das *tris*NTA wurde vielfach erfolgreich für die Fluoreszenzmarkierung mit verschiedenen Farbstoffen eingesetzt<sup>95</sup>. Induzierte Konformationsänderungen in Proteinen konnten so mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) verfolgt werden<sup>96,97</sup>. Auch die spezifische und stabile Markierung von His-*getaggt*en Proteinen auf Zelloberflächen wurde demonstriert<sup>98</sup>.



**Abb. 3:** Multivalente NTA-Chelatorköpfe von LATA et al.<sup>94</sup>. Die Anzahl der NTA-Gruppen (rot) reicht von zwei bis vier. Außerdem hat jedes Molekül ein freies Amin (blau), welches für weitere Modifikationen zur Verfügung steht.

**Tabelle 2:**  $K_D$ -Werte für die multivalenten Chelatorköpfe mit einem His<sub>6</sub>- oder His<sub>10</sub>-*getaggt*en Protein. Die Werte wurden von LATA et al. mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt<sup>94</sup>.

Chelatorkopf	His <sub>6</sub>	His <sub>10</sub>
<i>mono</i> NTA	14 ± 4 μM	-
<i>bis</i> NTA	270 ± 50 nM	240 ± 50 nM
<i>tris</i> NTA	20 ± 10 nM	40 ± 20 nM
<i>tetrakis</i> NTA	40 ± 20 nM	80 ± 30 nM

Es stellte sich heraus, dass das Beladen der NTA-Gruppen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führt. Diese Beobachtung ist auf einen Elektronen- und Energie-Transfer vom Fluorophor auf die Ni<sup>2+</sup>-Ionen zurückzuführen<sup>99-103</sup>. Durch das Einfügen eines großen, hochflexiblen Oligoethylenglykols zwischen den Ni<sup>2+</sup>-beladenen NTA-Gruppen und dem Fluorophor konnte dieser Effekt verringert werden<sup>98</sup>. Auch bei den von HUANG et al. synthetisierten trivalenten NTA-Chelatorköpfen war dieser Effekt zu beobachten<sup>93</sup> (**Abb. 2 c**). Von KAMOTO et al. wurde der Effekt sogar ausgenutzt, um die Fluoreszenzintensität eines Fluoreszein-markierten *mono*NTAs

durch einen intramolekularen Komplex zu quenchen und erst durch Bindung an einen His-Tag freizusetzen<sup>104,105</sup>.

LATA et al.<sup>94</sup> und TINAZLI et al.<sup>106</sup> synthetisierten als erste multivalente NTA-Chelatorköpfe, die durch ein freies Amin mit jeder beliebigen Sonde modifiziert werden können. Durch diese Möglichkeit wurde in Lösung die Verwendung von *tris*NTA(Biotin) zur reversiblen Biotinylierung His-getaggtter Proteine geschaffen<sup>107</sup>. Von ROULLIER et al. wurden *Quantum dots* mit dem *tris*NTA modifiziert und in Einzelmolekülstudien an Zelloberflächen eingesetzt<sup>108</sup>.

Da die meisten rekombinanten Proteine aufgrund der Reinigung als His-getaggttes Fusionsprotein vorliegen, hat die Verwendung der MCHs den Vorteil, dass die Proteine nicht weiter modifiziert werden müssen. Auch sind der Tag an sich und das bindende, modifizierte NTA von geringer Größe, wodurch die Bindung keinen Einfluss auf die Proteinaktivität hat. Ein weiterer großer Vorteil des Systems besteht darin, dass die MCHs leicht synthetisch zugänglich sind.

## I.2 Proteinimmobilisierung

Die Immobilisierung von Proteinen ist aufgrund von deren teilweise hohen Empfindlichkeit noch komplexer als deren Modifikation in Lösung, wobei auch zunächst modifizierte Proteine für die Immobilisierung genutzt werden können. Dabei sind Strategien, die keine weitere Modifikation des exprimierten (Fusions-)Proteins erfordern, zu bevorzugen. Das Protein sollte nach Bindung an die Oberfläche seine native Konformation und biologische Aktivität behalten, damit z.B. Bindungsstudien durchgeführt werden können. Für diesen Punkt entscheidend ist die Wahl der Oberfläche und der Immobilisierungsstrategie<sup>109</sup>. Für einen guten Proteinbiochip, d.h. für einen Chip mit aktiven, immobilisierten Proteinen, sollte beides mit möglichst vielen Proteinen kompatibel sein, so dass nicht für jedes Protein eine neue Strategie entwickelt werden muss. Außerdem sollte kontrollierbar sein, welche funktionelle Gruppe eines Proteins reagiert (chemische Selektivität) und welche Orientierung das Protein auf der Oberfläche einnimmt (Regioselektivität)<sup>110,111</sup>. Die Orientierung eines Proteins ist besonders dann wichtig, wenn Wechselwirkungen mit große Liganden oder andere Proteinen untersucht werden sollen, da eine solche Interaktion bei falscher Orientierung behindert werden kann. Besonders in Hinblick auf die Entwicklung und Anwendung

von Proteinbiochips in der Biosensorik oder Bioanalytik sollten alle Proteine möglichst dieselbe Orientierung aufweisen und homogen auf der Oberfläche verteilt sein. Bei manchen Anwendungen ist es zudem wichtig, dass eine ausreichend hohe Proteindichte auf der Oberfläche erzeugt wird, da diese die Nachweisgrenze des Chips bestimmt<sup>112,113</sup>. Besonders strukturierte Oberflächen haben in den letzten Jahren an Bedeutung zugenommen, da sie vielfach in Hochdurchsatzanalysen eingesetzt wurden<sup>114,115</sup>. Die folgenden Unterkapitel befassen sich im weitesten Sinne mit denen in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Herstellung und Strukturierung von planaren Proteinbiochips. Für einen ausführlicheren Überblick über mögliche Immobilisierungsstrategien wird auf Reviews verwiesen<sup>116-118</sup>.

## **I.2.1 Herstellungsstrategien für Proteinbiochips**

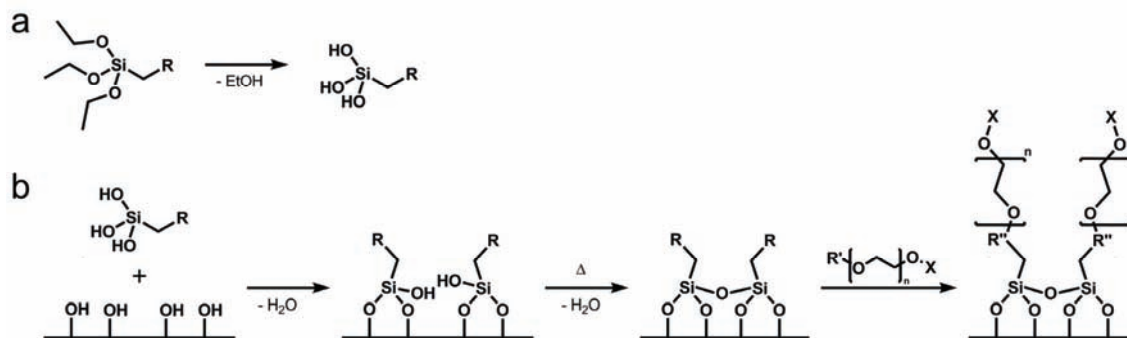
Die vorgesehene Anwendung bestimmt die Wahl der Oberfläche, auf welcher die Proteine immobilisiert werden sollen. Dabei werden hauptsächlich Gold- oder Glasoberflächen verwendet. Während Goldoberflächen bei der Rasterkraftmikroskopie, der Detektion durch Oberflächenplasmonresonanz und elektrochemischer Detektion Anwendung finden, wird Glas bei der optischen Detektion wie der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) und Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Für jede Oberflächenart gibt es verschiedene Strategien, um sie biokompatibel zu machen. Neben der entstehenden Biokompatibilität ist es bei der Modifikation von Oberflächen wichtig, dass am Ende eine einfache, möglichst einstufige Immobilisierung der Proteine realisiert werden kann. Das heißt auch, dass die Immobilisierung bei einem physiologischen pH-Wert möglich sein sollte, um eine eventuelle Denaturierung des Proteins zu vermeiden.

### **I.2.1.1 PEGylierung von Glasoberflächen**

Die wohl am häufigsten verwendete Modifikation von Glasoberflächen ist die Silanisierung mit anschließender PEGylierung. Die Modifikation startet normalerweise mit einer Aktivierung der Oberfläche durch Piranhalösung ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ ) oder Sauerstoffplasma, wobei reaktive Silanolfunktionen entstehen (**Abb. 4**).

Diese werden dann mit einem Organo- oder Trichlorsilan umgesetzt, welches zunächst hydrolysiert werden muss<sup>119-121</sup>. Die Hydrolyse muss dabei nicht separat

durchgeführt werden, sondern erfolgt direkt an der Glasoberfläche. Durch das Silan wird eine neue reaktive Gruppe eingeführt. Organosilane sind mit einer großen Vielzahl funktioneller Gruppen kommerziell erhältlich, so dass z.B. aus Aminen, Thiolen, Carbonsäuren oder Epoxiden frei gewählt werden kann. Die neue Funktionalität wird dann im nächsten Schritt mit einem Polyethylenglykol (PEG) weiter umgesetzt.



**Abb. 4:** Silanisierung und anschließende PEGylierung einer Glasoberfläche. **(a)** Hydrolyse der reaktiven Alkoxygruppen des Silans. **(b)** Das hydrolysierte Silan reagiert mit den aktivierten Silanolgruppen auf der Glasoberfläche. Durch thermisches Aushärten findet eine vollständige Vernetzung statt. Die anschließende PEGylierung erfolgt durch Umsetzung mit einem geeignet modifizierten Polyethylenglykol (PEG). R, R' = funktionale Gruppen; R'' = entstanden aus Reaktion von R mit R'; X = neue Funktionalität an der Oberfläche.

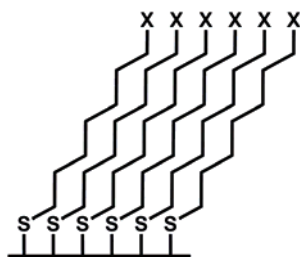
Auch PEGs sind mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen einfach oder doppelt modifiziert kommerziell erhältlich, so dass wieder eine neue Funktionalität auf der Oberfläche eingeführt werden kann. Welche Gruppen am PEG gewählt werden hängt von der vorangegangenen und anschließenden Umsetzung ab. PEGylierte Oberflächen zeichnen sich durch eine hohe Biokompatibilität aus<sup>122,123</sup>. Die minimale unspezifische Adsorption von Proteinen lässt sich damit erklären, dass es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem PEG und dem umgebenden Wasser kommt. Daraus resultieren hydratisierte Ketten mit hoher Flexibilität und Mobilität. Hinzu kommt eine sterische Stabilisierung, die durch das Ausschlussvolumen und den Verlust an Konformationsentropie bestimmt wird<sup>124,125</sup>. Die PEGs dienen gleichzeitig als Abstandhalter zwischen Oberfläche und Protein und verringern so das Risiko einer möglichen Konformations- und damit verbundenen Aktivitätsänderung.



### I.2.1.2 Modifikation von Goldoberflächen

Die am häufigsten verwendete Methode, um Goldoberflächen biokompatibel zu machen, ist das Aufbringen von selbstassemblierenden Monolagen (SAM, *self assembled monolayer*)<sup>126-128</sup> (**Abb. 5**).

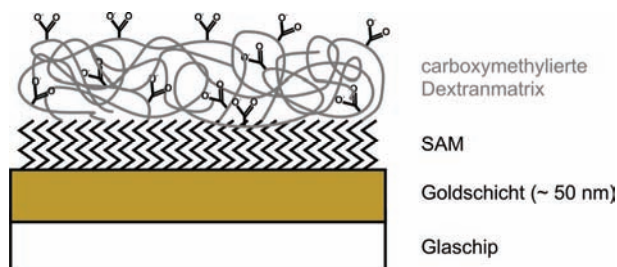
Die SAMs werden von Thiolen, Disulfiden und Sulfiden gebildet, sobald diese in einem organischen Lösungsmittel auf die Goldoberfläche aufgebracht werden. Bei der SAM handelt es sich nach der Fertigstellung um eine Monolage, deren chemische Eigenschaften durch die Länge der Alkylkette und die Kopfgruppe bestimmt werden.



**Abb. 5:** Darstellung einer selbstassemblierten Monolage (SAM) aus Thiolen auf einer Goldoberfläche. Die Alkylketten sind um etwa 30° geneigt. X = funktionale Kopfgruppe oder CH<sub>3</sub>.

Oftmals werden Mischungen verschiedener Thiole verwendet, um die Eigenschaften der SAM dem jeweiligen Problem anzupassen<sup>129</sup>. Thioverbindungen sind mit einer Vielzahl verschiedener Kopfgruppen kommerziell erhältlich, so dass je nach Art der anschließenden Modifikation entschieden werden kann, welche funktionellen Kopfgruppen zum Einsatz kommen. Die Eigenschaften der SAMs können durch kovalent an die Alkylkette gebundene Oligoethylglykole erweitert werden, wodurch eine biokompatible, proteinabweisende Oberfläche gebildet wird<sup>125,130-132</sup>.

Auch bei den kommerziell erhältlichen Sensorchips für die Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Spektroskopie handelt es sich um auf Glas aufgedampfte Goldschichten mit einer Alkylthiol-SAM<sup>133</sup> (**Schema 11**).



**Schema 11:** Schematische Darstellung eines kommerziellen SPR-Sensorchips. Die SAM auf einer Goldoberfläche ist mit einer carboxymethylierten Dextranmatrix beschichtet. Über die Carboxylgruppen kann die Oberfläche weiter modifiziert werden.

Die SAM auf solch einem Sensorchip wird für gewöhnlich aus 16-Meraptohexadecan-1-ol gebildet und erfüllt zwei Zwecke. Zum einen dient sie als Barriere, damit die später immobilisierten Liganden nicht mit dem Gold in Kontakt kommen können, was zu einer Denaturierung und/oder unspezifischen Adsorption führen könnte. Zum anderen werden über sie funktionelle Gruppen eingeführt, die für weitere Modifikationen des Chips zur Verfügung stehen. Die gängigsten Sensorchips werden mit einer etwa 100-200 nm dicken, carboxymethylierten Dextranmatrix beschichtet. Die Carboxylgruppen dienen als freie Bindungsstellen für Proteine oder Liganden. Durch die Wahl der geeigneten Kupplungschemie und -reagenzien lassen sich Amine, Thiole und Aldehyde kovalent immobilisieren<sup>134,135</sup>. Auch nach einer Kupplung verbleiben in der carboxymethylierten Dextranmatrix negative Ladungen. Diese führen zu einem Aufkonzentrieren positiv geladener Moleküle an der Oberfläche, was deren Bindung erleichtert. Des Weiteren wird durch die Dextranmatrix eine dritte Dimension eingeführt, wodurch, im Vergleich zu einer 2-dimensionalen Oberfläche, die Anzahl gebundener Moleküle erhöht wird. Dies verbessert die Sensitivität und das Signal-Rauschen-Verhältnis der Oberflächen. Aufgrund der hohen Flexibilität der Dextranmatrix werden mögliche Wechselwirkungen zwischen Proteinen und/oder Liganden nicht beeinflusst.

### **I.2.2 Immobilisierung von Proteinen**

Die Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen kann sowohl gerichtet, als auch zufällig erfolgen. Da es bei der nichtgerichteten Immobilisierung zu ungünstigen Orientierungen und damit verbundenem Aktivitätsverlust kommen kann, werden die gerichteten Immobilisierungen mit ortsspezifisch modifizierten Proteinen bevorzugt angewendet. Zu den nichtgerichteten Methoden zählen die nichtkovalente, unspezifische Adsorption aufgrund von Coulomb-, hydrophoben oder polaren Wechselwirkungen<sup>136</sup>, sowie die Chemiesorption durch Cysteinseitenketten auf Gold<sup>137,138</sup>. Bei nichtkovalenten Methoden ist darauf zu achten, dass die Bindung so stabil ist, dass ein Dissoziieren der Proteine von der Oberfläche verhindert wird. Zu einer ungerichteten, kovalenten Anbindung von Proteinen kann es durch die Immobilisierung über Amine<sup>139,140</sup> oder Carbonsäuren<sup>141,142</sup> kommen. Außerdem erfolgt sie oftmals bei der Verwendung photoreaktiver Oberflächen<sup>143,144</sup>.

Auch die gerichtete Immobilisierung von Proteinen kann über nichtkovalente und kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Dabei wird meist ein Fusionsprotein oder eine *single-cysteine* Mutante verwendet, um eine definierte Orientierung der Proteine auf der Oberfläche zu erzielen. Durch die Wahl einer geeigneten Oberfläche können im Prinzip alle Methoden, die für die Proteinmodifikation in Lösung (I.1) besprochen wurden, auf Oberflächen übertragen werden. So wurden für nichtkovalente Immobilisierungen oftmals biotinylierte Proteine auf (Strept)Avidin-Oberflächen eingesetzt<sup>145-147</sup>. Auch das Binden von Proteinen an spezifische, immobilisierte Antikörper wurde angewendet<sup>148,149</sup>. In Anlehnung an DNA-Mikroarrays fand die Bindung von DNA/Protein-Konjugaten auf DNA-Chips vielfach Nutzen<sup>150-152</sup>. Bei diesen Methoden ist darauf zu achten, dass die Bindungspartner auf der Oberfläche ((Strept)Avidin, Antikörper, DNA-Strang) meistens nicht gerichtet sind, wodurch die erhaltene Immobilisierung nur teilweise als gerichtet angesehen werden kann. Die gerichtete, kovalente Immobilisierung von Proteinen wurde sowohl über die in Abschnitt I.1 beschriebenen Inteine<sup>153,154</sup> und enzymatischen Systeme<sup>155,156</sup>, als auch über chemische Reaktionen wie die Staudinger-Ligation<sup>157,158</sup> oder Cycloaddition<sup>159-161</sup> verwirklicht.

Da in dieser Arbeit multivalente NTA-Oberflächen verwendet wurden, soll auf diese spezielle Art der Proteinimmobilisierung im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

### I.2.2.1 Immobilisierung auf NTA-Oberflächen

Bei der Immobilisierung *His-getaggt* Fusionsproteine auf NTA-Oberflächen handelt es sich um eine nichtkovalente, spezifische und gerichtete Bindung. Metallchelatisierende Oberflächen sind in der Biochemie weithin bekannt zur Bindung *His-getaggt* Fusionsproteine während der Reinigung. Der Schritt hin zu Oberflächen für die Bioanalytik oder Biosensorik war daher nicht sehr weit. Wie bereits erwähnt, weist ein *monoNTA* eine geringe Affinität für einen *His<sub>6</sub>-Tag* auf ( $K_D \approx 10 \mu\text{M}$  in Lösung). Allerdings zeigt sich an Oberflächen ein anderes Verhalten, weil der *His-Tag* bei einer genügend hohen Dichte an NTA-Gruppen mit mehreren NTAs gleichzeitig interagieren kann<sup>162</sup>. Durch solch eine Oberflächenmultivalenz wurde die stabile Immobilisierung *His-getaggt* Proteine an NTA-funktionalisierten Lipiden<sup>162-164</sup>, Alkylthiolen<sup>165</sup>, Dextranhydrogelen<sup>166,167</sup> und magnetischen Partikeln<sup>168,169</sup> erfolgreich durchgeführt. KHAN et al. verbanden für die stabile Immobilisierung zwei *His<sub>6</sub>-Tags* mit

einer 11 Aminosäuren langen Peptidsequenz und konnten zeigen, dass dieser deutlich stabiler bindet als ein einzelner oder auch zwei einzelne His<sub>6</sub>-Tags<sup>170</sup>. Auch diese Beobachtung weist eindeutig darauf hin, dass die stabile Immobilisierung durch die Wechselwirkung des Tags mit multiplen NTA-Gruppen erreicht wird.

Durch die Verwendung multivalenter NTA-Chelatorköpfe, wie sie von LATA et al. entwickelt wurden<sup>94</sup>, kann eine stabile Immobilisierung auch ohne hohe Dichte an NTA-Chelatorköpfen erreicht werden<sup>171,172</sup>. Eine solche Immobilisierung von Proteinen hat den großen Vorteil, dass sie auch bei sehr kleinen Flächen zu einer stabilen Bindung führt. Dadurch kann die Menge an gebundenen Proteinen reduziert werden, was oftmals besser interpretierbare Ergebnisse liefert, weil Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinen ausgeschlossen werden können. Die multivalenten NTA-Chelatorköpfe wurden mit Alkylthiolen verknüpft für die Herstellung von NTA-SAMs verwendet. Die Immobilisierung von His-getaggten Proteinen auf solchen SAMs wurde vielfach mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht<sup>106,173,174</sup>. Außerdem wurden sie für die Funktionalisierung von PEGylierten Glasoberflächen<sup>95</sup> oder Lipiden<sup>175-177</sup> benutzt. Mit solchen Lipiden wurden mittels kombinierter RfS und totalinterner Reflektions-Fluoreszenzspektroskopie (TIRFS, *total internal reflection fluorescence spectroscopy*) Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen untersucht<sup>175,178</sup>.

### **I.2.2.2 Methoden zur Strukturierung von NTA-Oberflächen**

Für die Strukturierung von Oberflächen gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten. Einige davon wurden in Verbindung mit multivalenten NTA-Oberflächen benutzt und sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden. Für weitere, teilweise gängigere Methoden, wie das Mikrokontakt-Drucken<sup>179</sup> (*microcontact printing*) oder die *Dip-Pen-Nanolithographie*<sup>180</sup>, wird auf hervorragende Reviews verwiesen<sup>114,118,181,182</sup>.

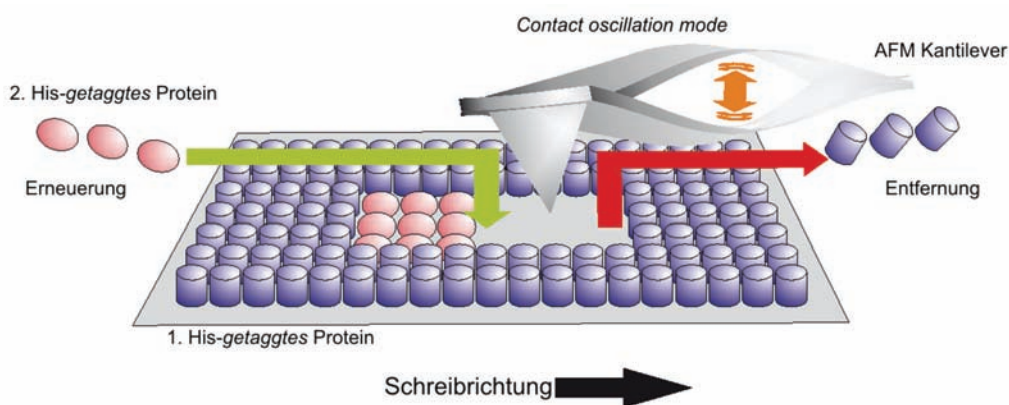
#### **I.2.2.2.1 Drucken von Alkylthiolen**

Gedruckte, bivalente NTA-Alkylthiole auf Goldoberflächen wurde von KLENKAR et al. mittels Ellipsometrie und SPR charakterisiert<sup>183</sup>. VALIOKAS et al. benutzten mono-, bis- und trivalente NTA-Alkylthiole, um Arrays mit unterschiedlich dichten NTA-Gruppen zu erzeugen<sup>171</sup>. Anschließend wurde die Bindung His-getaggtter Proteine auf diesen Oberflächen ebenfalls mittels SPR untersucht.

Das Drucken von Molekülen funktioniert im Prinzip wie bei einem Tintenstrahldrucker, weshalb von *Ink-Jet-Printing* gesprochen wird. Dabei wird das Molekül in einem Volumen im sub-Nanoliter Bereich ortsaufgelöst auf die entsprechende Oberfläche aufgebracht. Wichtig ist, dass der Tropfen nicht direkt auf die Oberfläche gedruckt wird, sondern eine kurze Distanz durch die Luft zurücklegt, damit er beim Aufkommen intakt bleibt und nicht verschmiert<sup>184</sup>. Oftmals werden zuvor mittels Mikrokontakt-Druck Barrieren auf die Oberfläche aufgebracht, zwischen denen das Drucken stattfindet.

### I.2.2.2.2 Native Protein-Nanolithographie

Die native Protein-Nanolithographie wurde von TINAZLI et al. entwickelt<sup>173,174</sup>. Dabei werden His-getaggte Proteine zunächst auf einer Alkylthiol-SAM mit multivalenten NTA-Chelatorköpfen immobilisiert. Die Proteine können in einem speziellen Modus der Rasterkraftmikroskopie (*contact oscillation mode*) so von der Oberfläche entfernt werden, dass die SAM und der MCH nicht beschädigt werden (**Schema 12**).



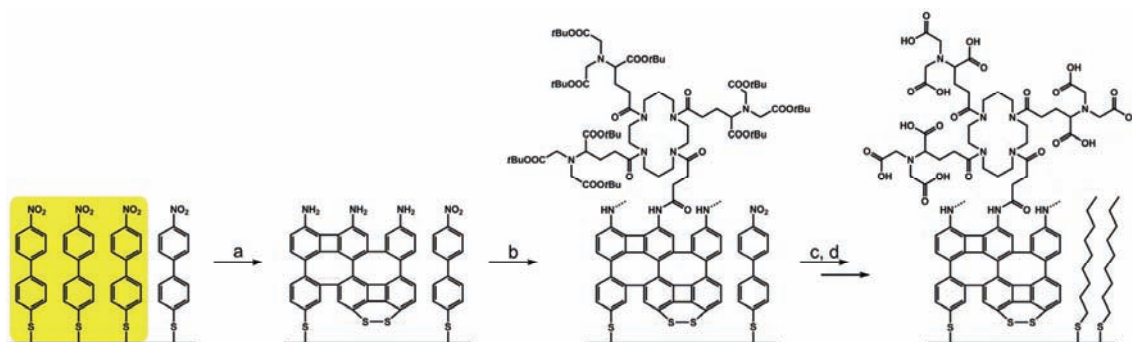
**Schema 12:** Schematische Darstellung der nativen Protein-Nanolithographie. Das erste, einheitlich immobilisierte Protein wird mittels *Contact oscillation mode* mit dem AFM-Kantilever entfernt. Die freien Plätze fungieren als Bindungsplätze für das zweite His-getaggte Protein. Das Auffüllen kann sukzessive oder simultan durchgeführt werden. Die Abbildung stammt aus TINAZLI et al.<sup>173</sup> und wurde angepasst.

An den frei gewordenen Stellen können neue Proteine binden, wobei dieser Prozess sukzessive oder *in situ* unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden kann.

Mit der Methode wurden Strukturen bis zu einer minimalen Größe von 50 nm erzeugt<sup>173</sup>.

### I.2.2.2.3 Elektronenstrahl-Lithographie

Für die Erzeugung strukturierter *tris*NTA-Oberflächen mittels Elektronenstrahl (*E-Beam*)-Lithographie wurde von TURCHANIN et al. zunächst eine aromatische SAM mit dem Elektronenstrahl strukturiert<sup>185</sup> (**Abb. 6**). Dabei kam es zur Reduktion der endständigen Nitrogruppen zu Aminogruppen und zu einer Quervernetzung der darunter liegenden Aromaten. Das *tris*NTA wurde in einem nächsten Schritt über geeignete Chemie an die Oberfläche gekuppelt und entschützt. Abschließend wurden in den unbestrahlten Bereichen die Aromaten gegen eine proteinabweisende Matrix-SAM ausgetauscht. Die Bindung von Proteinen an die Oberfläche wurde mittels Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

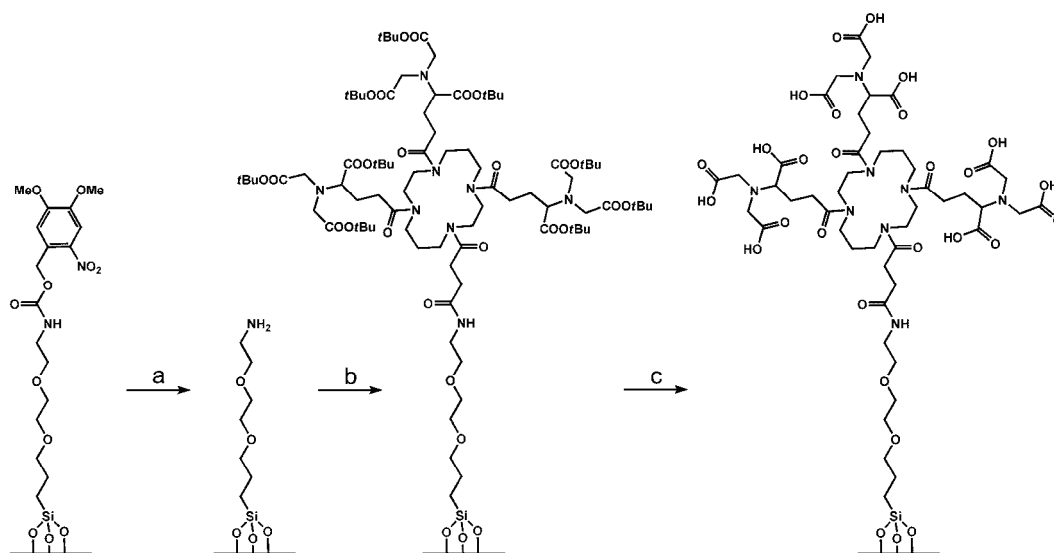


**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Elektronenstrahl-Lithographie. **(a)** Durch teilweises Bestrahlen der aromatischen SAM mit einem Elektronenstrahl kommt es zur Reduktion der Nitrogruppen und zu einer Quervernetzung der aromatischen Bereiche. **(b)** Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(OtBu) an die generierten Aminofunktionen. **(c)** Entschützen des *tris*NTAs. **(d)** Austausch der unmodifizierten Bereiche gegen eine Alkylthiol-SAM mit Oligoethylenglykol-Einheiten. Aus sterischen Gründen ist nur ein *tris*NTA dargestellt.

### I.2.2.2.4 Photo-Lithographie

Wie bei der *E-Beam*-Lithographie (I.2.2.2.3) kann eine Oberfläche auch durch Licht so aktiviert werden, dass die ortsaufgelöste Kupplung eines multivalenten NTA-Chelatorkopfes stattfinden kann. ALONSO et al. synthetisierten zu diesem Zweck Silane mit Nitroveratryl (Nvoc)-geschützten Aminogruppen<sup>186</sup> (**Abb. 7**). Diese wurden für die Modifikation von Glasoberflächen eingesetzt. Die Nvoc-Schutzgruppe kann durch Licht

abgespalten werden und setzt ein reaktives Amin frei. Die freien Aminofunktionen wurden mit einem Carboxy-funktionalisierten *tris*NTA umgesetzt und die spezifische Bindung His-getaggtter Proteine nach dem Entschützen mittels RfS charakterisiert. Durch die Verwendung einer Maske während der Belichtung ließen sich strukturierte Oberflächen darstellen.



**Abb. 7:** Funktionalisierung der photolabilen Oberflächen. **(a)** Die Belichtung mit UV-Licht führt zur Abspaltung der Nitroveratryl-Schutzgruppe. **(b)** Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(OtBu) an die freien Aminofunktionen. **(c)** Entschützung des *tris*NTAs.

Auch mit monovalenten NTA-Gruppen an der Oberfläche wurden Strukturen mittels Photo-Lithographie erzeugt. REYNOLDS et al. nutzten den Effekt, dass durch das Bestrahlen von Oligoethylenglykolen mit UV-Licht endständige Aldehydfunktionen generiert werden<sup>187</sup>. Diese wurden mit einem aminofunktionalisierten *mono*NTA umgesetzt, und die Bindung von His-getaggttem gelbfluoreszierendem Protein (YFP, *yellow fluorescent protein*) mittels Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Belichtung wurde sowohl mit einer Maske als auch mittels *scanning near field photolithography* durchgeführt, wodurch Strukturen von unter 200 nm erzeugt werden konnten.

## II ZIEL DER ARBEIT

Die von LATA<sup>188</sup> und TINAZLI et al.<sup>106</sup> entwickelten multivalenten NTA-Chelatoren mit ihren nanomolaren Bindungsaffinitäten stellen eine vielversprechende Methode zur Markierung und Immobilisierung von His-*getaggen* Proteinen dar. In den meisten Fällen benötigt das System keine weitere aufwendige Modifikation der Proteine, da His-*getaggte* Proteine in biochemischen Laboren standardmäßig vorhanden sind. Die NTA-Verbindungen sind chemisch leicht zugänglich und einfach zu modifizieren. Das Ziel dieser Arbeit war es, das Potential der MCHs für die spezifische Markierung, Manipulation und Immobilisierung von Proteinen voll auszunutzen. Dazu wurden die folgenden Projekte bearbeitet, die sich mit den unterschiedlichen Aspekten und Anwendungen der multivalenten NTA-Chelatoren befassen.

### II.1 Fluoreszente *tris*NTAs mit verbesserter Quantenausbeute

In diesem Teilprojekt lag das Augenmerk auf der Quantenausbeute fluoreszenter *tris*NTA-Verbindungen. Es sollte erstmals systematisch untersucht werden, wie die Fluoreszenzintensität mit dem Abstand zwischen der Ni<sup>2+</sup>-beladenen *tris*NTA-Gruppe und dem Fluorophor zusammenhängt. Die Synthese und Charakterisierung *tris*NTAs mit starren Abstandshaltern variabler Länge stellten die Hauptaufgaben dieses Projektes dar.

### II.2 Manipulation makromolekularer Proteinkomplexe

Erstmals sollten die multivalenten NTA-Chelatoren benutzt werden, um einen makromolekularen Proteinkomplex gezielt reversibel zu deaktivieren. Der Abbau von Proteinen durch das 20S Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* sollte durch das *tetrakis*NTA blockiert werden. Dabei sollte gezeigt werden, dass die Peptidaseaktivität des Proteasoms während der Blockierung erhalten bleibt und das Binden des *tetrakis*NTAs den Eintritt von Proteinen in den Proteasomkomplex verhindert.



### **II.3 *tris*NTA modifizierte Goldcluster**

Die fluoreszenten *tris*NTA-Verbindungen fanden vielfach erfolgreich Anwendung für die Markierung von Proteinen. In diesem Teilprojekt sollte das *tris*NTA mit einem Goldcluster so modifiziert werden, dass es auch in der Elektronenmikroskopie (EM) verwendet werden kann. Dafür sollte ein neues *tris*NTA-Derivat synthetisiert werden, welches an einen 1.4 nm großen Goldcluster gekuppelt werden kann. Nach der Kupplung sollte die Charakterisierung des modifizierten Goldclusters und dessen Verwendung in der EM erfolgen.

### **II.4 Orthogonale *bis*NTAs**

Ziel dieses Projektes war es, orthogonale Bindungspaare zwischen bivalenten NTA-Chelatoren und *His*-Tags zu finden. Dafür sollte zunächst die Synthese rigider NTAs mit unterschiedlichem Abstand der NTA-Gruppen voneinander entwickelt werden. Anschließend sollten die Dissoziationskonstanten mit verschiedenen *His*-Tags bestimmt werden.

### **II.5 Aktivierbare *tris*NTAs**

In diesem Projekt sollte sich mit der Entwicklung inaktiver *tris*NTAs, welche durch Licht aktiviert werden können, befasst werden. Dabei sollte eine intramolekulare NTA/*His*-Wechselwirkung für die Inaktivierung genutzt werden. Durch die Variation der Anzahl intramolekularer Histidine sollte eine systematische Untersuchung des Ausmaßes der Inaktivierung in Lösung und auf Oberflächen erfolgen. Des Weiteren sollte die Verwendung der Substanzen für die Generation von strukturierten Proteinbiochips genauer betrachtet werden.

### III THEORETISCHE GRUNDLAGEN

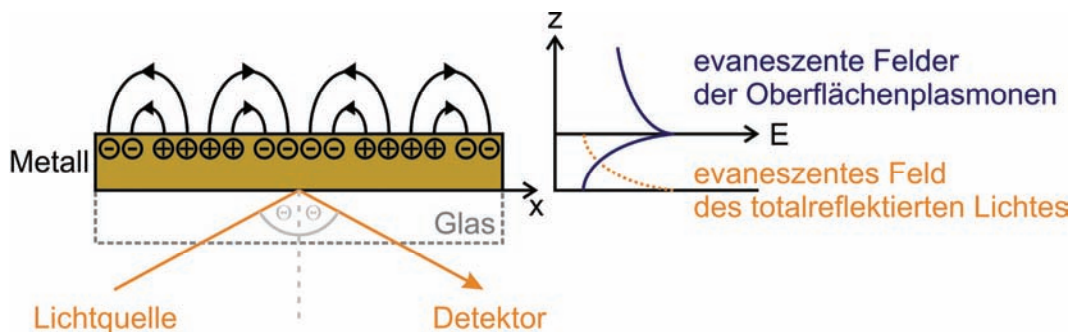
#### III.1 Oberflächenplasmonresonanz

Mit der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR, *surface plasmon resonance*) können Wechselwirkungen von Molekülen oder Partikeln mit Oberflächen untersucht werden. Durch eine geeignete Modifikation der Oberfläche und der Immobilisierung eines Liganden können dessen Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern (Analyten) charakterisiert werden. Als Messgröße dient bei der SPR eine Änderung des Brechungsindex an der Grenzfläche zwischen einer leitenden Goldoberfläche und einer Lösung. Durch die Anlagerung von Analyten an die Oberfläche, bzw. den immobilisierten Liganden, wird eine solche Änderung im Brechungsindex hervorgerufen. Aus den erhaltenen Messdaten lassen sich anschließend kinetische und thermodynamische Größen der untersuchten Interaktion ermitteln. In den meisten Fällen werden SPR-Messungen zur Charakterisierung biochemischer Systeme eingesetzt, z.B. um Protein/Protein-, Protein/Ligand- oder Protein/DNA-Interaktionen zu analysieren. Im Folgenden wird das Prinzip der SPR-Spektroskopie näher erläutert.

##### III.1.1 Physikalisches Prinzip

Die Totalreflektion von Licht kann an Grenzflächen immer dann auftreten, wenn ein Übergang von einem Medium mit hohem Brechungsindex, z.B. Glas, in ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex, z.B. Wasser, stattfindet. Damit dieses Phänomen auftritt, muss der Winkel des einfallenden Lichts größer als der sogenannte kritische Winkel sein. Die elektromagnetische Welle kann dann nicht mehr in das Medium mit dem niedrigeren Brechungsindex eintreten. Bei Glasoberflächen, die mit einem Edelmetall wie Gold beschichtet sind, wird das Licht nicht totalreflektiert, sondern gibt einen Teil seiner Energie durch eine evaneszente Welle an den Metallfilm ab. Dabei werden die freien Elektronen des Metalls angeregt und fangen an kollektiv zu oszillieren. Dieser Vorgang wird als Oberflächenplasmon bezeichnet (**Schema 13**).

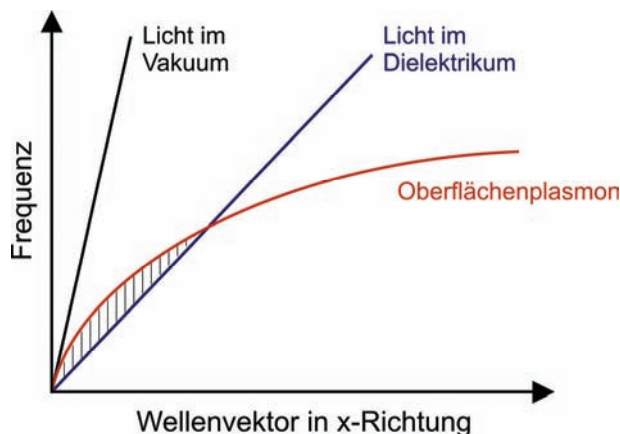
Das Oberflächenplasmon kann als eine stehende Welle angesehen werden, die sich entlang der Metalloberfläche verläuft und deren Intensität mit der Ausbreitungslänge abnimmt. Eine resonante Anregung durch einfallendes Licht kann nur bei einem bestimmten Winkel, dem SPR-Winkel erfolgen. Hier stimmt der Wellenvektor des einfallenden Lichtes mit dem des Oberflächenplasmons überein.



**Schema 13:** Schematische Darstellung eines Oberflächenplasmons an einer Metalloberfläche. Die Ladungen oszillieren kollektiv und können in x-Richtung als stehende Welle betrachtet werden. Die damit verbundene elektromagnetische Strahlung fällt als evaneszente Welle in beide z-Richtungen hin exponentiell ab.

Durch die Abgabe von Energie an das Oberflächenplasmon weist das totalreflektierte Licht beim SPR-Winkel ein scharfes Minimum auf, welches zum Auslesen benutzt wird. Dem Oberflächenplasmon zugehörig ist ein elektromagnetisches Feld, das senkrecht zur Metalloberfläche stehend in beide Richtungen exponentiell abnimmt (evaneszierend). Dabei beträgt die Ausbreitungslänge in das wässrige Medium etwa die Hälfte der verwendeten Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes. Aufgrund dieses evaneszierenden Feldes sind die Resonanzfrequenz des Oberflächenplasmons und damit auch der SPR-Winkel abhängig vom Brechungsindex direkt an der Metalloberfläche.

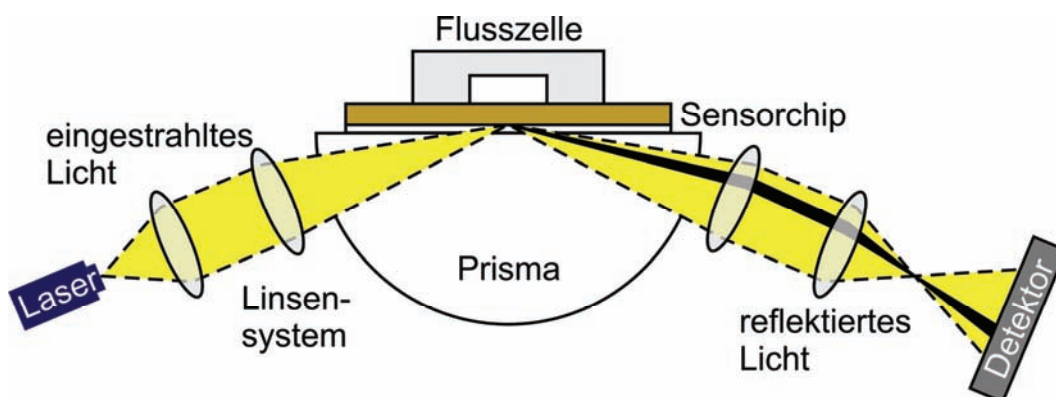
Damit die Oberflächenplasmonen mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden können, müssen Energie und Impuls des Photons erhalten bleiben. Das heißt, dass sich die Dispersionskurven, also die Abhängigkeit der Energie vom Impuls, der Oberflächenplasmonen und des Lichtes schneiden müssen. Bei einer Ausbreitung des Lichtes im Vakuum (**Schema 14**; schwarze Kurve) schneiden sich die beiden Kurven nicht. Um einen Schnittpunkt zu generieren, muss die Steigung der Lichtgeraden reduziert werden. Dies kann, da die Steigung vom Brechungsindex des Mediums abhängt durch welches das Licht fällt, durch eine Änderung des Brechungsindexes erzielt werden. Leitet man das Licht durch ein dielektrisches Medium (Prisma) mit einem Brechungsindex  $> 1$ , dann senkt sich die Steigung der Geraden ab (**Schema 14**; blaue Kurve) und sie schneidet die Kurve der Oberflächenplasmonen (**Schema 14**; rote Kurve) in einem Punkt. An diesem Schnittpunkt ist die Anregung der Oberflächenplasmonen durch Licht unter Erhalt von Impuls und Energie möglich.



**Schema 14:** Dispersionskurven für ein Photon im Vakuum (schwarz), bzw. in einem Dielektrikum mit  $n > 1$  (blau) und für ein Oberflächenplasmon (rot). Ein Schneiden der Oberflächenplasmonkurve mit der Lichtgeraden kann durch eine Änderung des Brechungsindex erzielt werden.

### III.1.2 Umsetzung im SPR-Spektrometer

Die Umsetzung des Prinzips in einem kommerziellen SPR-Spektrometer erfolgt nach dem KRETSCHMANN-RAETHER-Aufbau (**Schema 15**).



**Schema 15:** Schematischer Aufbau eines SPR-Spektrometers. Durch ein Linsensystem wird p-polarisiertes, monochromatisches Licht keilförmig fokussiert und so in ein Prisma eingekoppelt, dass es an der Goldoberfläche des Sensorchips totalreflektiert wird. Entspricht der Einfallswinkel dem SPR-Winkel, so wird die Energie des Lichtes auf das Oberflächenplasmon übertragen und nicht reflektiert. Das am Detektor aufgezeichnete Minimum bei einem bestimmten Winkel verschiebt sich, sobald sich der Brechungsindex an der Goldoberfläche innerhalb der Flusszelle ändert.

P-polarisiertes, monochromatisches Licht wird so in ein Prisma eingekoppelt, dass es an der Goldschicht des aufgetragenen Sensorchips totalreflektiert wird. Durch eine keilförmige Fokussierung werden dabei verschiedene Einfallswinkel abgedeckt. Das totalreflektierte Licht wird durch einen Photodioden-Array Detektor aufgenommen und der SPR-Winkel durch das Intensitätsminimum bestimmt. Die Änderungen im

Brechungsindex werden durch eine Verschiebung des SPR-Winkels detektiert und in RUs (*responce units*) umgewandelt. Damit erlaubt die SPR-Spektroskopie die Untersuchung von Oberflächeninteraktionen in Echtzeit und ohne zuvor notwendige Markierung von Proben. Da das Licht die Probe nicht durchdringt, können auch farbige, trübe oder lichtundurchlässige Proben vermessen werden. Für die Menge an gebundenem Analyten gilt, dass 1 RU etwa 1 pg Analyt/mm<sup>2</sup> entsprechen. Außerdem muss beachtet werden, dass durch einen Unterschied in den Brechungsindices des Lauf- und Probenpuffers ein Hintergrundsignal generiert wird, das keiner Bindung zugeschrieben werden kann. Die gemessenen Bindungskurven müssen abschließend um dieses Signal korrigiert werden.

## III.2 Fluoreszenzmikroskopie

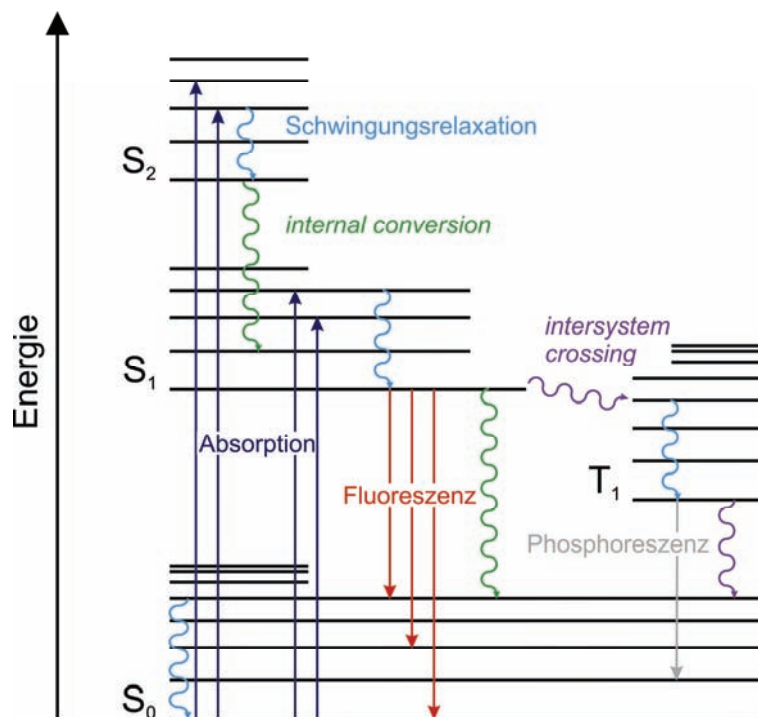
### III.2.1 Theorie zur Fluoreszenz

Im folgenden Abschnitt wird zunächst erklärt, wie Fluoreszenz entsteht. Anschließend werden die beiden in dieser Arbeit benutzten Methoden für die Fluoreszenzmikroskopie genauer vorgestellt.

Fluoreszenz ist eine spontane Emission von Licht, die nur so lange auftritt, wie das photolumineszente Molekül mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Am besten erklären lässt sich die Theorie der Fluoreszenz unter Verwendung eines JABLONSKI-Diagramms. Dabei handelt es sich um ein partielles Energiediagramm, in welchem die Energieniveaus und möglichen Übergänge eines Moleküls dargestellt sind. In **Schema 16** ist ein solches Diagramm für den elektronischen Grundzustand ( $S_0$ ), den ersten ( $S_1$ ) und zweiten angeregten Singulettzustand ( $S_2$ ) sowie den ersten angeregten Triplettzustand ( $T_1$ ) eines Moleküls dargestellt. Die einzelnen Energieniveaus sind dabei in ihre Schwingungsniveaus unterteilt.

Die Absorption von Lichtquanten führt dazu, dass das Molekül, abhängig von der Energie des Lichtes, in einen angeregten Zustand übergeht. Im Gegensatz zum Grundzustand befindet sich im angeregten Zustand ein Elektron in einem antibindenden Molekülorbital. Die Elektronen bleiben dabei meistens gepaart, was bedeutet, dass weiterhin ein Singulettzustand vorliegt. Das angeregte Molekül kann auf verschiedene Weisen in den Grundzustand zurückkehren, wobei zunächst eine strahlungslose Schwingungsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand des jeweiligen angeregten

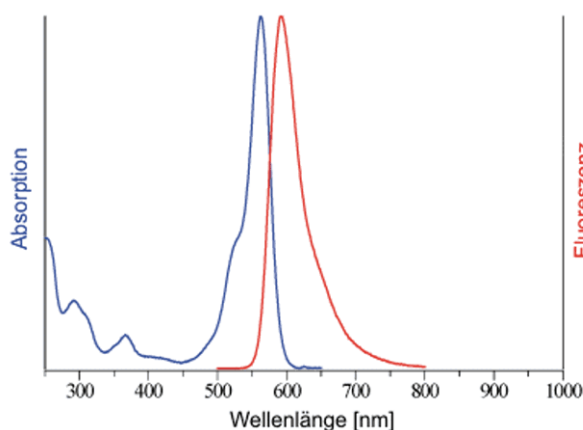
elektronischen Zustands stattfindet. Befindet sich das Molekül in einem höheren als dem ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ), so erfolgt eine strahlungslose innere Umwandlung (*internal conversion*) in den  $S_1$ -Zustand. Auch hier erfolgt eine Schwingungsrelaxation bis zum Schwingungsgrundzustand von  $S_1$ .



**Schema 16:** Partielles JABLONSKI-Diagramm für ein photolumineszierendes Molekül. Dargestellt sind die Absorption von Lichtquanten (dunkelblau), die möglichen strahlungslosen Übergänge wie *internal conversion* (grün), Schwingungsrelaxation (hellblau) und *intersystem crossing* (lila) und die Übergänge, die unter Abgabe von Photonen verlaufen, wie Fluoreszenz (rot) und Phosphoreszenz (grau).

Aus dem Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  ist, unter Abgabe eines Photons, ein Übergang in einen beliebigen Schwingungszustand des Grundzustandes ( $S_0$ ) möglich. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz (**Schema 16**; rot) bezeichnet und hat mit  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  s eine geringe Lebensdauer. Sie kann immer dann auftreten, wenn die Abgabe von Photonen im Vergleich zu strahlungslosen Relaxationsprozessen schnell ist. Dabei kann neben der inneren Umwandlung bei einem Übergang aus dem Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  auch eine externe Umwandlung, z.B. durch die Energieabgabe an das Lösungsmittel oder ein anderes Molekül, stattfinden. Als zweiter Prozess, bei dem Photonen freigesetzt werden, ist die Phosphoreszenz (**Schema 16**; grau) zu nennen. Phosphoreszenz tritt dann auf, wenn das Molekül aus dem Schwingungsgrundzustand vom  $S_1$  durch Spintumkehr (**Schema 16**;

lila, *intersystem crossing*) in den ersten angeregten Triplettzustand ( $T_1$ ) übergeht. Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Übergang ist gering, weil er mit einer Änderung der Multiplizität einhergeht. Fällt nun das Molekül aus dem Schwingungsgrundzustand des Triplettzustands  $T_1$  in den singulären Grundzustand  $S_0$  zurück und emittiert dabei ein Photon, so nennt man diesen Vorgang Phosphoreszenz. Aufgrund der verbotenen Übergänge von einem Singulett- in einen Triplettzustand und zurück verläuft dieser Prozess sehr viel langsamer als die Fluoreszenz und hat eine Lebensdauer von  $10^{-4}$ -10 s.



**Schema 17:** Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von ATTO565. Das Emissionsspektrum ist deutlich rotverschoben. Die Abbildung wurde von [www.ATTO-Tec.com](http://www.ATTO-Tec.com) übernommen und abgeändert.

Betrachtet man sich die Pfeillängen im JABLONSKI-Diagramm (**Schema 16**), dann fällt auf, dass die Absorptionspfeile deutlich länger sind als die der Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Die Länge der Pfeile ist proportional zur Energie, d.h. die bei der Absorption benötigte Energie ist (meistens) höher, als die, die durch Photonenabgabe freigesetzt wird. Dieses Phänomen wird durch die verschiedenen Möglichkeiten der strahlungslosen Deaktivierung hervorgerufen. Es hat zur Folge, dass das Emissionsspektrum eines Fluorophors in der Regel im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu größerer Wellenlänge (niedrigerer Energie) verschoben ist (**Schema 17**). Diese Verschiebung wird als STOKES-Shift bezeichnet. Bei der Phosphoreszenz tritt eine noch stärkere Rotverschiebung auf, weil der Triplettzustand  $T_1$  energetisch meist tiefer liegt als der erste angeregte Singulettzustand  $S_1$ .

Damit Moleküle als Fluorophore eingesetzt werden können, ist es wichtig, dass die Deaktivierung des angeregten Zustandes durch Photonenabgabe schneller verläuft als konkurrierende, strahlungslose Prozesse. Außerdem sollte der angeregte Zustand eine geringe Lebensdauer besitzen, um ein *intersystem crossing* zu verhindern. Die intensivste und stabilste Form der Fluoreszenz liefern Moleküle mit energiearmen  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergangsniveaus, aber auch  $n \rightarrow \pi^*$  Übergänge sind möglich. Die Voraussetzung

für einen energiearmen  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang ist vor allem bei aromatischen Verbindungen und hochkonjugierten Doppelbindungsstrukturen erfüllt, wobei die Quantenausbeute durch die Zahl der aromatischen Ringe erhöht werden kann. Durch Substituenten am aromatischen System werden Verschiebungen der Absorptions- und Emissionsmaxima erzielt. Zudem erhöhen starre Molekülstrukturen die Quantenausbeute von Fluorophoren, weil bei flexibleren Strukturen eine strahlungslose Deaktivierung leichter über interne Umwandlungen stattfinden kann als bei starren Strukturen.

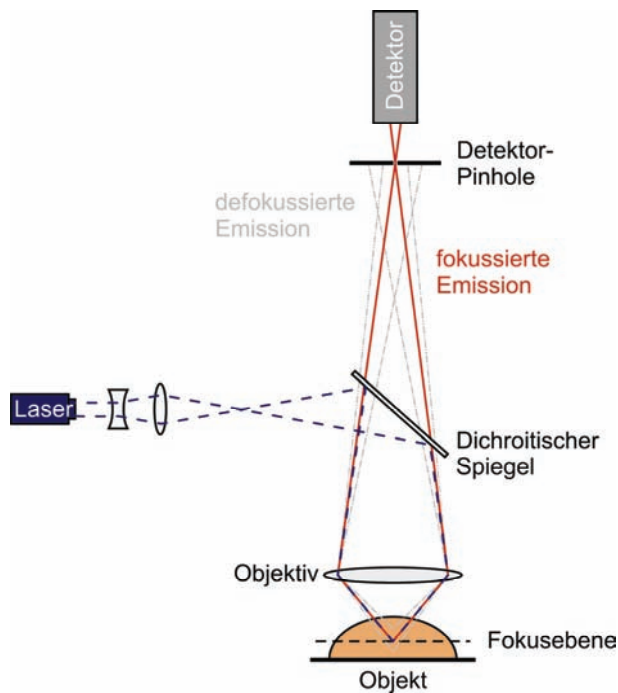
### III.2.2 Einsatz in der Mikroskopie

Die Mikroskopie im Allgemeinen kann Strukturen und Objekte sichtbar machen, die mit dem menschlichen Auge nicht erkennbar sind. Bei der Fluoreszenzmikroskopie nutzt man das Phänomen der Fluoreszenz aus, um kleine, fluoreszenzmarkierte Proben oder Bereiche in Objekten sichtbar zu machen. Durch den STOKES-Shift wird bei der Fluoreszenzmikroskopie für die Anregung und Emission nur ein Strahlengang benötigt, in welchen ein Strahlenteiler integriert ist. Dieser reflektiert das Anregungslicht, während er das Emissionslicht zum Detektor durchlässt. Die spektrale Trennung von Anregung und Emission hat außerdem den Vorteil, dass das Signal-Rauschen-Verhältnis drastisch verbessert wird. Dadurch ermöglicht wird die Detektion von fluoreszenten Einzelmolekülen. Im Folgenden sind die beiden in dieser Arbeit verwendeten Verfahren genauer vorgestellt.

#### III.2.2.1 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Bei der konfokalen Laser-Rastermikroskopie (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) wird das zu untersuchende Objekt nicht komplett ausgeleuchtet, sondern einzelne Ebenen werden punktweise mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert. Da die einzelnen Punkte anschließend mittels PC zu einem Bild zusammengefügt werden, spricht man auch von einem Punktscanner. Der Strahlengang eines typischen CLSMs ist in **Schema 18** dargestellt.





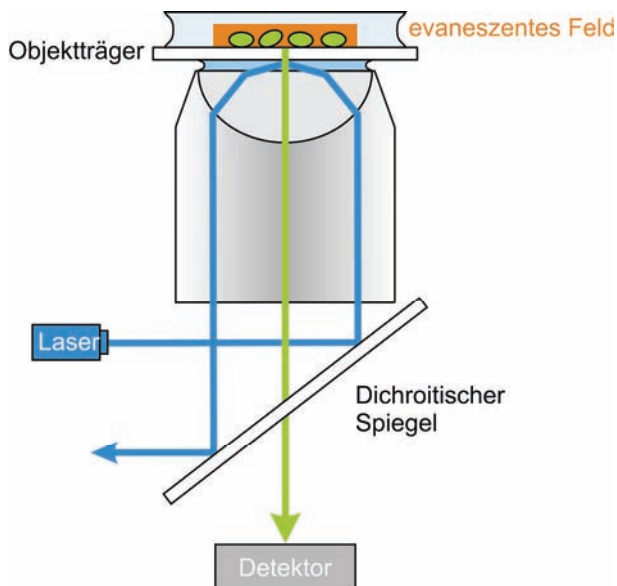
**Schema 18:** Schematischer Aufbau eines konfokalen Laser-Rastermikroskops (CLSM). Das Anregungslicht (dunkelblau) wird durch einen dichroitischen Spiegel auf eine definierte Ebene im Objektiv punktförmig fokussiert. In dieser Fokusebene wird das Objekt punktwise abgerastert. Durch das Detektor-Pinhole kann nur das Emissionslicht, welches aus der Fokusebene stammt (rot), den Detektor erreichen. Emissionslicht aus anderen Ebenen (grau) wird nicht durchgelassen.

Das besondere an einem CLSM ist das Detektor-Pinhole, welches sich zwischen Objekt und Detektor befindet. Durch dieses wird erreicht, dass am Detektor nur das Emissionslicht ankommt, welches von Objekten aus der Fokusebene stammt. Je kleiner das Pinhole, desto weniger Licht von Objekten außerhalb der Fokusebene wird detektiert. Informationen, die sich ober- oder unterhalb der Fokusebene befinden, werden durch diese Methode ausgeblendet. Durch das aufeinanderfolgende Fokussieren und Abrastern verschiedener Schärfenebenen ist es möglich, ein 3D-Bild des zu untersuchenden Objekts anzufertigen. Dadurch wird die genaue Untersuchung dickerer Proben realisierbar.

### III.2.2.2 Totalinterne Reflektions-Fluoreszenzmikroskopie

Wie bei der CLSM wird bei der TIRF-Mikroskopie (TIRFM, *total internal reflection fluorescence microscopy*) die Anregung der Fluorophore in einer Fokusebene erreicht. Dadurch werden unerwünschte Fluoreszenzsignale ausgeblendet. Die TIRFM bedient sich dabei der Tatsache, dass es bei einer totalinternen Reflektion von Licht an einer Grenzfläche zur Ausbildung eines evaneszenten Feldes kommt. Totalinterne Reflektion kann immer dann auftreten, wenn Licht aus einem Medium mit hohem Brechungsindex in ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex übergeht und ein

bestimmter Winkel nicht unterschritten wird. Der wichtigste Teil des Strahlenganges eines TIRF-Mikroskops ist in **Schema 19** abgebildet.



**Schema 19:** Schematische Darstellung des Strahlenganges im Objektiv eines TIRF-Mikroskops. Der Laserstrahl (blau) wird parallel zur optischen Achse verschoben in das Objektiv eingekoppelt. Durch die totalinterne Reflexion am Objektträger wird ein evaneszentes Feld (orange) generiert, welches die Fluorophore nahe der Oberfläche anregt. Das totalintern reflektierte Licht und das Emissionslicht (grün) laufen beide durch das Objektiv und werden durch einen dichroitischen Spiegel getrennt.

Das evaneszente Feld regt die Fluorophore nur in direkter Nähe zur Oberfläche an, während weiter entfernte Fluorophore nicht angeregt werden. Dieser Vorgang hängt damit zusammen, dass die Intensität des evaneszenten Feldes exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche abnimmt. Für die Intensität  $I$  der evaneszenten Welle gilt:

**Gleichung 1:** 
$$I(z) = I(0) \cdot e^{-z/d}$$

- mit
- $I(z)$  = Intensität an der Position  $z$
  - $I(0)$  = Intensität an der Oberfläche
  - $z$  = Abstand zur Grenzfläche
  - $d$  = Eindringtiefe der evaneszenten Welle

Für die Eindringtiefe  $d$  gilt wiederum:

**Gleichung 2:** 
$$d = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \Theta - n_2^2}}$$

- mit
- $\lambda$  = Anregungswellenlänge
  - $n_1$  = Brechungsindex vom Objektträger (Glas: 1.52)
  - $n_2$  = Brechungsindex des Mediums
  - $\Theta$  = Einfallswinkel

Im Gegensatz zur CLSM kann bei der TRIFM die abzubildende Ebene nicht frei gewählt werden, sondern beschränkt sich immer auf den Raum direkt über dem Objektträger. Als Objektträger dienen, aufgrund der Dicke, im Normalfall Deckgläser.

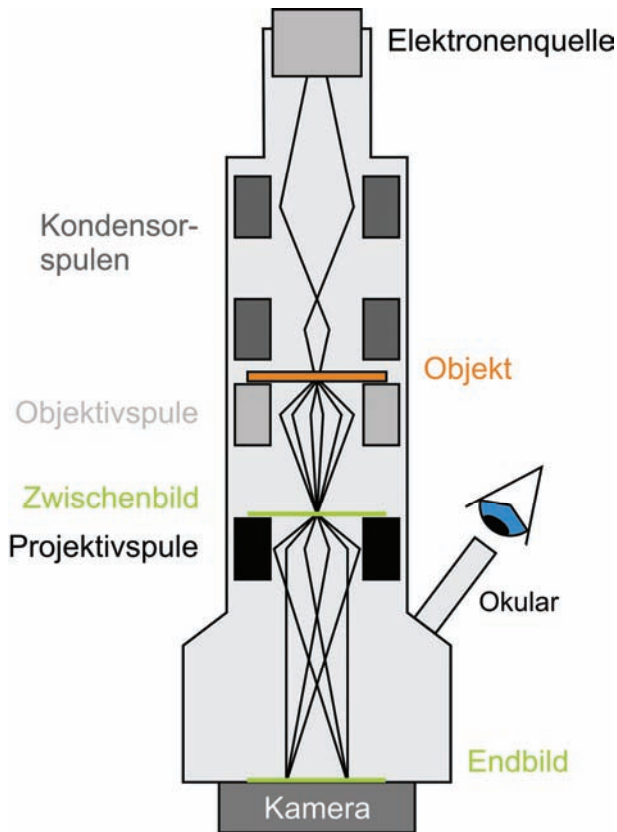
Die TIRFM weist im Vergleich zur CLSM ein noch verbessertes Signal-Rauschen-Verhältnis und eine erhöhte z-Auflösung auf. Dadurch wird die Visualisierung von Proben bis hin zur Einzelmolekülbeobachtung erlaubt, die eine sehr geringe Fluoreszenzintensität aufweisen. Außerdem wird durch das Anregen der Fluorophore mit einer im Verhältnis zum Laser energiearmen Strahlung (dem evaneszenten Feld) das Bleichen der Fluorophore verringert. Auch lebende Zellen lassen sich mit dieser Methode meist schonender und länger untersuchen als mit herkömmlichen Methoden. Zudem wird die störende Autofluoreszenz in Zellen unterdrückt.

### III.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Wie bei einem Lichtmikroskop der Lichtstrahl, so werden bei einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Elektronenstrahlen zum Abbilden von Objekten benutzt. Dabei durchdringen die Elektronen die Probe, weshalb diese sehr dünn sein muss. Der Strahlengang in einem TEM ist vereinfacht in **Schema 20** wiedergegeben. Als Elektronenquelle wird eine Kathode elektrisch so weit aufgeheizt, dass sie Elektronen emittiert. Diese werden in Richtung einer Anode, welche ein zentrales Loch aufweist durch das der Elektronenstrahl tritt, beschleunigt. Dann trifft der Elektronenstrahl auf ein Spulensystem, das für die Fokussierung des Elektronenstrahls verwendet wird. Als erstes wird der Elektronenstrahl durch die Kondensospulen auf die Objektebene fokussiert. Hier durchdringt er das zu untersuchende Objekt und wird anschließend durch die Objektspulen aufgeweitet. Bis zur Bildebene wird der Elektronenstrahl durch weitere Spulen, die Projektivspulen, nochmals aufgeweitet, um die Endvergrößerung zu erhöhen. Ein hohes Vakuum im TEM ist wichtig, damit die mittlere freie Weglänge der Elektronen genügend groß wird und damit keine weitere Ablenkung der Elektronen nach dem Durchdringen des Objektes stattfindet.

Es werden grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Streuung unterschieden, sobald ein Elektron mit einem Objekt wechselwirkt: (i) die elastische Streuung, bei der das Elektron von einem positiv geladenen Kern abgelenkt wird und dabei keine Energie

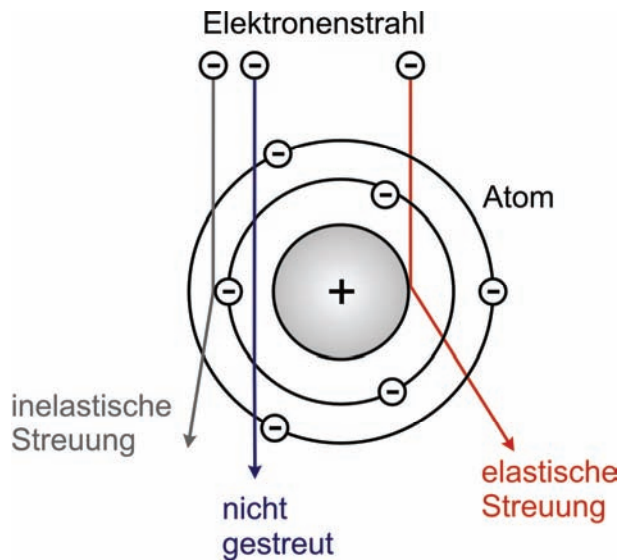
verliert (**Schema 21**; rot), (ii) die inelastische Streuung, bei der das Strahlelektron mit der Elektronenhülle des Objektes wechselwirkt und dabei Energie auf diese überträgt (**Schema 21**; grau).



**Schema 20:** Vereinfachte Darstellung des Strahlengangs in einem TEM. Der beschleunigte Elektronenstrahl wird durch Kondensorenspulen auf die Objektebene fokussiert, wo er das Objekt durchdringt. Anschließend weiten Objekt- und Projektivspulen den Strahl weiter auf, um die benötigte Endvergrößerung zu erzielen.

Bei der inelastischen Streuung werden Röntgenstrahlung und Sekundärelektronen emittiert. Beide verschlechtern den Kontrast des TEM-Bildes, und daher ist die inelastische Streuung unerwünscht. Bei der elastischen Streuung kommt es zu einer Ablenkung des Strahlelektrons aus der Elektronenbahn aufgrund der COULOMB-Wechselwirkung mit einem positiv geladenen Atomkern. Diese fällt umso stärker aus, je stärker die COULOMB-Wechselwirkung ist, d.h. sie ist abhängig von der Kernladungszahl und der Anzahl der passierten Atome. Die Ablenkung der Strahlenelektronen führt aufgrund des Objekt potentials zu einer Verzögerung des Elektronenstrahls gegenüber dem ungebeugten Strahl (Nullstrahl). Beim Austritt aus dem Objekt tritt so eine geringe Phasenverschiebung aber keine Amplitudenänderung auf. Die Differenz beider Wellen liefert eine Strahlung mit gleicher Wellenlänge, kleinerer Amplitude und einem Gangunterschied von  $\approx \pi/2$ . Um einen detektierbaren Phasenkontrast zu bekommen, muss nun der Nullstrahl oder der gebeugte Strahl um  $\pi/2$

verschoben werden. Auf diese Weise wird eine Interferenz mit detektierbarer Änderung der Amplitude erreicht. Realisiert wird dies bei der Elektronenmikroskopie (EM) durch eine entsprechende Änderung des Objektivspulenstroms.



**Schema 21:** Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und Objekt. Es treten die elastische Streuung ohne Energieverlust (rot) und die inelastische Streuung mit Energieverlust (grau) auf. Die Auslenkung ist bei der elastischen Streuung größer als bei der inelastischen.

Für die EM lässt man das zu untersuchende Objekt aus einer Lösung auf ein vorbehandeltes EM-Grid adsorbieren. Nach dem Trocknen kann dieses zur Kontrastverbesserung mit verschiedenen Methoden behandelt werden. Dabei wird das Objekt von Metall umgeben, welches bei der anschließenden EM den Kontrast liefert. Der Eigenkontrast der Objekte ist dagegen vernachlässigbar. Meist werden für diesen Zweck Schwermetallsalze von Uran oder Wolfram verwendet. Als schonendere Methode kann, bei einem genügend hohen Eigenkontrast der Objekte, die sogenannte Kryo-EM durchgeführt werden. Hierbei wird das Objekt in einer wässrigen Lösung auf dem Objektträger in flüssigem Ethan schockgefroren. Bei dem Verfahren bildet sich amorphes Eis, welches das Objekt umschließt. Während der anschließenden EM muss zum Erhalt des Eises mit flüssigem Stickstoff gearbeitet werden.

## IV METHODEN

### IV.1 Biochemische Methoden

#### IV.1.1 Expression und Reinigung His-getaggtter Proteine

##### IV.1.1.1 Überexpression der Proteine

Das LB-Medium für die Kultivierung von *E. coli* wurde mit jeweils 100 µg Ampicillin/mL versetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden His-getaggte Proteasome und Maltose-Bindungsproteine (MBP) exprimiert und gereinigt.

*$\alpha$ N- oder  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom:* Für die Vorkultur wurden 40 mL LB-Medium mit den entsprechenden Transformanten aus Kryostocks angeimpft. Nach Inkubation unter Schütteln (über Nacht, 180 rpm, 37°C) wurde die Vorkultur in 1 L LB-Medium überführt, und die Kultivierung wie gehabt fortgesetzt. Sobald eine optische Dichte von OD<sub>600</sub> = 0.6 erreicht worden war, wurde die Überexpression des Proteasoms durch Zugabe von IPTG (1 mM) induziert. Nach vierstündiger oder über Nacht Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 x g, 15 min, 4°C, Sorvall RC 3C Plus), das Zellpellet in 20 mL Aufschlusspuffer resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym versehen. Erfolgte die Reinigung nicht unmittelbar nach dem Abzentrifugieren, dann wurden die Zellen bei -20°C gelagert.

*MBP-H<sub>6,10</sub>:* 100 mL LB-Medium wurden mit Transformanten direkt von der Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Es wurden 50 mL der Vorkultur in 900 mL LB-Medium gegeben, und die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0.6 weiter inkubiert. Die Überexpression des Proteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, und die Kultivierung für vier Stunden fortgesetzt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (4000 x g, 15 min, 4°C, Sorvall RC 3C Plus) wurden diese in 30 mL Aufschlusspuffer resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und bei -20°C gelagert.

Die Zusammensetzung der benutzten Lösungen und Puffer ist unter VIII.1.2 und VIII.1.3.1 zu finden.

#### IV.1.1.2 Zellaufschluss

*$\alpha$ N- oder  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom:* Frische *E. coli* Zellpellets wurden in 20 mL Aufschlusspuffer resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Tiefgefrorene Zellen mit Lysozym ließ man zunächst auftauen und inkubierte anschließend noch 30 min auf Eis. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe von Ultraschall (6 x 1 min, *output control* 5-6, 50% *output*, Branson sonifier) auf Eis. Durch Zentrifugation (42000 rpm, 30 min, 4°C, Beckmann L70 *Ultracentrifuge*) wurden die Zellreste vom Lysat abgetrennt.

*MBP-H<sub>6,10</sub>:* Tiefgefrorene Zellen in Aufschlusspuffer mit Lysozym wurden aufgetaut und noch 30 min auf Eis inkubiert. Mithilfe von Ultraschall (3 x 4 min, *output control* 5-6, 50% *output*, Branson sonifier) wurden die Zellen auf Eis aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (42000 x g, 30 min, 4°C, Beckmann L70 *Ultracentrifuge*).

#### IV.1.1.3 Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie

Die immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC, *immobilized metal chelat affinity chromatography*) ist eine weit verbreitete Methode zur Reinigung von Histidin-getaggen Proteinen. Auf dem Säulenmaterial befindliche Iminodiessigsäure (IDA)-Gruppen werden mit zweiwertigen Ionen wie Ni<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup> beladen, an deren freie Koordinationsstellen Histidin komplexieren kann. Die Elution des Proteins kann durch einen Imidazol-, Histidin- oder pH-Gradienten erfolgen. Eine Regeneration der Säule wird durch Waschen mit EDTA (50 mM) zum Entfernen der gebundenen Ionen erreicht.

*$\alpha$ N- oder  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom:* Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde auf eine Ni<sup>2+</sup>-beladene und in Laufpuffer äquilibrierte *HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP* Säule (1 mL, GE Healthcare) mit einer Flussrate von 1 mL/min an einem ÄKTAexplorer 100 System (GE Healthcare) aufgetragen. Die Proteinabsorption wurde bei 280 und 260 nm verfolgt. Nach Beendigung des Auftrags wurde zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine mit zehn Säulenvolumen Laufpuffer gewaschen. His-getaggte Proteasome wurden anschließend durch einen Stufengradienten mit Imidazol (10 Säulenvolumen (CV, *column volume*): 0-20% B; 3 CV: 35% B; 20 CV: 35-100% B) bei einer Flussrate von 2 mL/min eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden

vereinigt und in Gegenwart von 2 mM EDTA bis auf 500  $\mu$ L im Amicon Ultra-15 Konzentrator (MWCO: 30 kDa, 4000 x g, Multifuge 1S-R, Haraeus) konzentriert.

*MBP-H<sub>6,10</sub>*: Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde auf eine mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladene und in Laufpuffer äquilibrierte *HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP* Säule (5 mL, GE Healthcare) mit einer Flussrate von 4 mL/min an einem ÄKTAprime System (GE Healthcare) aufgetragen. Nach dem Auftragen erfolgte ein Waschschriff mit 2% Elutionspuffer. Die Elution des Proteins erfolgte durch einen linearen Gradienten mit Imidazol (3 CV: 2-60% B) bei einer Flussrate von 1 mL/min. Zu den vereinigten Proteinfraktionen wurde EDTA in einer Endkonzentration von 2 mM gegeben. Gegebenenfalls erfolgte ein Einengen im Amicon Ultra-15 Konzentrator (MWCO: 10 kDa, 4000 x g, Multifuge 1S-R, Haraeus) auf ein Endvolumen von 6 mL.

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist unter VIII.1.3.1 zu finden.

#### IV.1.1.4 Präparative Gelfiltrationen

Bei der Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) oder auch Gelfiltration erfolgt die Trennung von Proteinen aufgrund ihres hydrodynamischen Radiuses. Das Säulenmaterial besteht hierbei aus einem mikroporösen Gel, in dessen Poren die kleineren Proteine hinein diffundieren können und dadurch später eluiert werden. Die größeren Proteine können nicht in die Poren eindringen und eluieren daher bei geringerem Retentionsvolumen. Durch Eichung der Säule mit Standardproteinen bekannter Größe kann aus dem Elutionsvolumen auf die Größe des zu analysierenden Proteins geschlossen werden.

*$\alpha$ N- oder  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom*: Die nach der IMAC (IV.1.1.3) erhaltenen His-getaggten 20S Proteasome wurde zur weiteren Reinigung auf eine äquilibrierte Superose<sup>TM</sup> 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Äquilibrierung der Säule und Proteinelution erfolgten mit HBS-Puffer bei einer Flussrate von 0.5 mL/min an einem ÄKTAexplorer 100 System (GE Healthcare). Die isolierten Proteasome wurden nach der Zugabe von 10% (v/v) Glycerin aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

*MBP-H<sub>6,10</sub>*: Für die weitere Reinigung der MBPs wurden diese auf eine in HBS-Puffer äquilibrierte Superdex<sup>TM</sup> 200 HiLoad<sup>TM</sup> 16/60 Säule (GE Healthcare) an einem ÄKTAprime System (GE Healthcare) aufgetragen. Nach der Elution mit einer Flussrate



von 1.5 mL/min wurden die proteinhaltigen Fraktionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Zusammensetzung des HBS-Puffers siehe VIII.1.1.

#### **IV.1.2 Analytische Gelfiltrationen**

Im Gegensatz zur präparativen Gelfiltration werden bei der analytischen Gelfiltration deutlich kleinere Säulen verwendet, wodurch wesentlich geringere Probenmengen benötigt werden.

Die für die Gelfiltrationen verwendeten Puffer sind unter VIII.1.3.2 zu finden.

##### **IV.1.2.1 20S Proteasome**

Für analytische Gelfiltrationsläufe mit 20S Proteasomkomplexen wurde eine Superose<sup>TM</sup> 6 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare) mit HBS-Puffer in einem SMART (GE Healthcare) oder Ettan<sup>TM</sup> LC System (GE Healthcare) verwendet. 20S Proteasome wurden mit den MCHs im gewünschten Verhältnis gemischt und so lange wie angegeben auf Eis inkubiert. Die Proben wurden in einem Volumen von jeweils 50 µL auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 50 µL/min bei 10°C eluiert. Zum Entfernen der gebundenen Chelatorköpfe wurden Probe und Laufpuffer mit 50 bzw. 100 mM Imidazol versetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf die Säule erneut für 30 min auf Eis inkubiert.

##### **IV.1.2.2 MBP-H<sub>6</sub> mit *tris*NTA-Nanogold®**

Für die Gelfiltrationen von MBP-H<sub>6</sub> mit dem *tris*NTA-Nanogold® wurde eine Superdex<sup>TM</sup> 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare) mit HBS-Puffer in einem Ettan<sup>TM</sup> LC System (GE Healthcare) verwendet. Die Proben wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt und nach 30 min Inkubation in jeweils 50 µL Volumen auf die Säule aufgetragen. Durchgeführt wurden die Läufe mit einer Flussrate von 70 µL/min bei 10°C. Um die Reversibilität und Stabilität der Bindung zu testen, wurden die Proben und der Laufpuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen (10-100 mM) Imidazol versetzt.

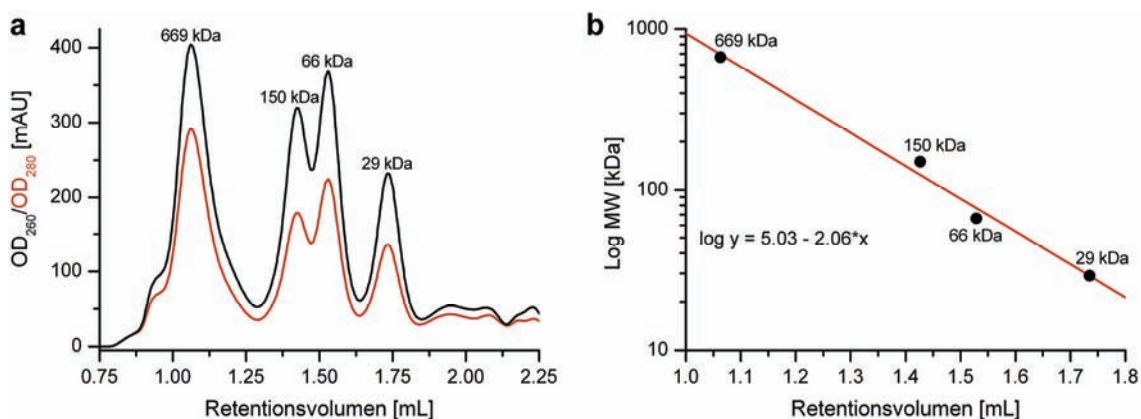
#### IV.1.2.3 MBP-H<sub>6</sub> mit photoaktivierbaren *tris*NTAs (*PA**tris*NTAs)

Zur Bestimmung der an das MBP-H<sub>6</sub> gebundenen Menge an photoaktivierbaren *tris*NTAs (*PA**tris*NTAs) wurden die unbelichteten und belichteten Reaktionsmischungen (IV.2.6.1) auf eine mit HBS-Puffer äquilibrierte Superdex<sup>TM</sup> 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Die Proben wurden in einem Volumen von 10 µL injiziert, und die Gelfiltrationsläufe wurden bei 10°C mit einer Flussrate von 70 µL/min an einem Ettan<sup>TM</sup> LC System (GE Healthcare) durchgeführt.

Die Detektion erfolgte bei 280 und 565 nm, wobei die Absorption bei 565 nm benutzt wurde, um die Menge an MBP-gebundenem *PA**tris*NTA zu bestimmen. Bestimmt wurde zunächst die Gesamtfläche unter der Kurve. Der Anteil der Fläche, der mit dem MBP eluierte, entsprach der Menge an gebundenem *PA**tris*NTA.

#### IV.1.2.4 Kalibrierung der Superdex<sup>TM</sup> 200 PC 3.2/30 Säule

Gelfiltrationssäulen können mit globulären Standardproteinen definierter Größe kalibriert werden, so dass aus dem Elutionsvolumen Rückschlüsse auf die Größe eines globulären Proteins geschlossen werden können. Eine Superdex<sup>TM</sup> 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare) wurde an einem Ettan<sup>TM</sup> LC System (GE Healthcare) mit vier verschiedenen Standardproteinen kalibriert. Es wurde eine Mischung 80 µg Thyroglobulin (669 kDa), 50 µg Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), 80 µg BSA (66 kDa) und 45 µg Carboanhydrase (29 kDa) in einem Volumen von 50 µL aufgetragen.



**Abb. 8:** Kalibrierung einer Superdex<sup>TM</sup> 200 PC 3.2/30 Säule mit Standardproteinen bekannter Größe. **(a)** Elutionsprofil aus dem das Retentionsvolumen der Proteine bestimmt wurde. **(b)** Logarithmische Auftragung der bekannten Molekulargewichte gegen das Retentionsvolumen.

Durch die logarithmische Auftragung des Molekulargewichtes gegen das Retentionsvolumen wird eine Gerade erhalten, aus deren Steigung sich die Größe eines globulären Proteins oder Komplexes in kDa bestimmen lässt.

#### IV.1.3 Markierung des 20S Proteasoms mit multivalenten Chelatorköpfen

Um eine stabile Bindung des unmarkierten *tetrakis*NTAs an das Proteasom zu gewährleisten, wurde das  $\alpha$ N- oder  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom für 3 h bei 10°C mit einem 10-fachen Überschuss an *tetrakis*NTA und einem 40-fachen Überschuss an Ni<sup>2+</sup>-Ionen in HBS-Puffer unter kontinuierlichem Durchmischen inkubiert.

Im Falle der fluoreszenzmarkierten Chelatorköpfe oder dem *tris*NTA(Nanogold®) wurde auf die Ni<sup>2+</sup>-Zugabe verzichtet, da der Chelatorkopf bereits vorher mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladen worden war (IV.2.4). Hier wurden Proteasom und Chelatorkopf im gewünschten Verhältnis miteinander gemischt und für 3 h in HBS-Puffer auf Eis inkubiert.

#### IV.1.4 Bestimmung der Zahl gebundener Chelatorköpfe pro 20S Proteasom

Um die Anzahl der pro Proteasomkomplex gebundenen multivalenten Chelatorköpfe zu bestimmen, wurde sowohl das  $\alpha$ N- als auch das  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom wie unter IV.1.3 beschrieben mit fluoreszenzmarkiertem *tris*- und *tetrakis*NTA markiert. Nach Isolation der Komplexe mittels Gelfiltration (IV.1.2.1) wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Test (IV.1.5) und die Chelatorkopfkonzentration über die charakteristische Absorption des jeweiligen Fluorophors (IV.3.1.2) bestimmt.

#### IV.1.5 Bicinchoninsäure-Test

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Test<sup>189</sup> (*Micro BCA<sup>TM</sup> protein assay kit*, PIERCE) zur Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bildung eines farbigen Komplexes zwischen Cu<sup>+</sup>-Ionen und zwei BCA-Molekülen. Im alkalischen Milieu entsteht Cu<sup>+</sup> durch die Oxidation von Proteinen aus Cu<sup>2+</sup> und bildet durch anschließende Inkubation mit BCA einen farbigen Komplex, der bei 562 nm detektiert werden kann. Als Referenzprotein für die Eichung wird Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum*

*albumin*) eingesetzt. Der BCA-Test eignet sich für Proteinkonzentrationen von 0.5-40 µg/mL und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### IV.1.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) erlaubt die Auftrennung intakter, aktiver Proteinkomplexe nach ihrer Größe. Durch den Erhalt der Proteinstruktur während der Elektrophorese ist der Nachweis der Proteinaktivität nach der Elektrophorese im Gel möglich.

Für die diskontinuierliche, native PAGE mit dem 20S Proteasomkomplex wurden ein Sammelgel mit Acrylamidanteil von 3.5% und ein Trenngel mit einem Acrylamidanteil von 4.5% benutzt. Außerdem wurde eine EDTA-Konzentration von 100 µM eingesetzt, um eine Beeinflussung der NTA/His-*Tag*-Wechselwirkung zu minimieren. Die Gele wurden mithilfe einer selbst gebauten Gießapparatur hergestellt, hatten eine Größe von 12 x 8 cm und eine Dicke von 0.75 mm. Es konnten bis zu acht Gele gleichzeitig gegossen werden.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der nativen Polyacrylamidgele (fünf Gele).

	Trenngel 4.5%	Sammelgel 3.5%
Acrylamid/Bisacrylamid (30%; 42:1)	7.5 mL	-
Acrylamid/Bisacrylamid (20%; 4:1)	-	3.5 mL
Milli-Q-Wasser	30.0 mL	11.5 mL
Trenngelpuffer (4-fach)	12.5 mL	-
Sammelgelpuffer (4-fach)	-	5.0 mL
APS (10%-ig)	200 µL	120 µL
TEMED	50 µL	40 µL

Die Lösungen für das Trenngel wurden gemischt, und als letztes wurden Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben, um die Polymerisation zu starten. Die Mischung wurde in die vorbereiteten Gelkammern gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel nach demselben Prinzip auf das

Trenngel gegossen. Für die spätere Probenauftragung wurden Kämme für zehn Taschen eingesetzt.

Die Proteinproben wurden mit 4-fachem Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer bei 100 V für ca. 4 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Größenstandards wurden Standardproteine für die Gelfiltration mitlaufen gelassen.

Für die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer siehe VIII.1.4.

## **IV.1.7 Färben von Polyacrylamid-Gelen**

### **IV.1.7.1 Coomassie-Färbung**

Die Proteinbanden wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung mit einer Coomassie Brilliant Blau G250-Färbelösung für ca. 30 min gefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Färbelösung durch Entfärbelösung entfernt, bis der gewünschte Kontrast erreicht worden war.

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist unter VIII.1.4.1 zu finden.

### **IV.1.7.2 Detektion von Nanogold®**

Für die Detektion des Nanogoldes® nach der nativen PAGE wurde *LI Silver* der Firma Nanoprobes verwendet. Die beiden Lösungen wurden frisch in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) miteinander gemischt und auf das mit Milli-Q-Wasser gewaschene Gel gegeben. Sobald der gewünschte Kontrast erreicht war (braune Färbung der Banden mit Nanogold®, ca. 5 min), wurde die Entwicklung durch ausgiebiges Waschen mit Milli-Q-Wasser gestoppt.

## **IV.1.8 Peptidaseaktivität des 20S Proteasoms im Nativgel**

Die Peptidaseaktivität des 20S Proteasomkomplexes nach der nativen PAGE kann mithilfe des fluorogenen Tetrapeptides Suc-LLVY-AMC untersucht werden. Bei dem verwendeten Peptid führt die protolytische Spaltung durch das Proteasom zur Freisetzung von fluoreszierendem 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)<sup>190</sup>.

Das Gel wurde zu diesem Zweck nach der Elektrophorese mit einer 100 mM Lösung von Suc-LLVT-AMC in Tris-Puffer mit MgCl<sub>2</sub>, KCl und DTT für 20 min bei 37°C überschichtet. Anschließend wurde das Gel mit Milli-Q-Wasser gewaschen. Die Detektion des freigesetzten AMC's erfolgte mithilfe des Lumi Imagers F1<sup>TM</sup> (Roche) bei einer Wellenlänge von 520 nm. Fluoreszierende Banden zeigten die Lage der aktiven Proteasome nach der Elektrophorese im Gel an.

Die exakte Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer ist unter VIII.1.4.2 zu finden.

## IV.2 Chemische Methoden

### IV.2.1 Modifizierung der multivalenten Chelatorköpfe

Die von LATA et al. entwickelten MCHs<sup>94</sup> können über ihre reaktiven Aminogruppen einerseits direkt mit Sonden, wie z.B. Fluorophoren oder Biotinderivaten, umgesetzt werden. Andererseits kann eine neue funktionelle Gruppe, z.B. eine Carboxyl- oder Thiolgruppe, eingeführt werden, die weitere Modifikationsstrategien erlauben.

Im Falle einer funktionalen Aminogruppe wird meistens ein *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester als Aktivester eingesetzt. Viele Verbindungen lassen sich bereits als NHS-Ester käuflich erwerben. Liegt eine Thiolgruppe vor, so wird oftmals auf ein Maleimid- oder Iodacetamid-Derivat zurückgegriffen. Die Maleimide haben dabei einen leichten Vorteil in Hinblick auf Selektivität und Quantität, wenn im richtigen pH-Bereich gearbeitet wird.

#### IV.2.1.1 Umsetzung aminofunktionalisierter Chelatoren mit Fluorophoren

Für die Kupplung eines NHS-Fluorophors an das Aminocaprinsäure-*tris*NTA (**11**) oder das *tetrakis*NTA (**12**) wurde der jeweilige Chelatorkopf mit 2 äq. des Fluorophors in DMF umgesetzt. Die Reaktionsmischung mit einer Konzentration von 25 mM Chelatorkopf wurde mit 20 äq. DIPEA über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Reinigung erfolgte mittels *reversed-phase* (RP)-HPLC mit einer C<sub>18</sub>-Säule (Vydac® 218TP, Grace). Als Laufmittel wurden Milli-Q-Wasser und Acetonitril mit jeweils 0.2% TFA verwendet. Ein linearer Gradient wurde dem jeweiligen Konjugat

angepasst. Nach dem Gefriertrocknen erfolgte die Charakterisierung durch Elektrospray-Ionisations (ESI, *electrospray ionisation*)- oder Matrix-unterstützte-Laserdesorptions-Ionisations (MALDI, *matrix assisted laser desorption ionisation*)-Massenspektrometrie (MS).

#### IV.2.1.2 Umsetzung von Thio-*tris*NTA mit Fluorophoren

Das Thio-*tris*NTA (**19**) wurde mit einem 1.2-fachen Überschuss des entsprechenden Maleimid-Fluorophors in 20 mM Hepes, pH 7.0 gelöst. Die 5 mM *tris*NTA-Lösung wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Reinigung erfolgte über eine C<sub>18</sub>-Säule (Vydac® 218TP, Grace) mittels RP-HPLC mit einem linearen Gradienten von Acetonitril in Milli-Q-Wasser mit 0.2% TFA. Der Gradient wurde dem jeweiligen Konjugat angepasst. Die Produkte wurden gefriergetrocknet und mittels ESI- oder MALDI-MS identifiziert.

#### IV.2.1.3 Umsetzung von Thio-*tris*NTA mit Monomaleimido-Nanogold®

##### IV.2.1.3.1 Verunreinigtes Thio-*tris*NTA

Es wurden 12 nmol gefriergetrocknetes Monomaleimido-Nanogold® (**18**) in 20 µL DMSO und 180 µL Milli-Q-Wasser gelöst. Zu der Lösung wurden 1.9 µL einer 125 mM Lösung (0.24 µmol) von einer Mischung aus Thio-*tris*NTA (**19**) und Thio(*t*Bu)-*tris*NTA (**23**) in Milli-Q-Wasser gegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 10°C unter kontinuierlichem Durchmischen inkubiert. Anschließend erfolgte die Beladung des *tris*NTAs mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen durch Zugabe eines 15-fachen Überschusses an Ni<sup>2+</sup>-Ionen. Nach 30 min wurde das Ni<sup>2+</sup>-beladene *tris*NTA(Nanogold®) (*tris*NTA(NG), **17**) mittels analytischer Gelfiltration mit einer Superdex<sup>TM</sup> 200 PC 3.2/30 Säule (GE Healthcare) an einem Ettan<sup>TM</sup> LC System (GE Healthcare) von überschüssigen Ni<sup>2+</sup>-Ionen und nicht reagiertem **19** und **23** abgetrennt. Versuche hatten ergeben, dass, durch den hohen Überschuss an eingesetztem **19**, auf eine Abtrennung von möglicherweise nicht umgesetzten **18** mittels Anionenaustauschchromatographie verzichtet werden konnte.

#### IV.2.1.3.2 Reines Thio-*tris*NTA

Es wurden 12 nmol gefriergetrocknetes **18** in 20  $\mu$ L DMSO und 180  $\mu$ L Milli-Q-Wasser gelöst. Zu der Lösung wurden 2.4  $\mu$ L einer 5 mM Lösung (12 nmol) von reinem **19** in Milli-Q-Wasser gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Beladung des *tris*NTAs mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen durch Zugabe eines 15-fachen Überschusses an Ni<sup>2+</sup>-Ionen. Für die Reinigung wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

1. Methode: Nach 30 min wurden die überschüssigen Ni<sup>2+</sup>-Ionen mittels Pufferwechsel im Konzentrator (Roti®-Spin mini, MWCO: 3 kDa, Carl Roth®; 14000 x g, *centrifuge* 5415R, Eppendorf) entfernt. Das erhaltene, Ni<sup>2+</sup>-beladene **17** wurde zum Entfernen von nicht umgesetzten Nanogold® **18** auf eine mit His<sub>6</sub>-Peptiden modifizierte Säule (IV.2.7) gegeben und mit steigenden Konzentrationen von Imidazol (20, 50, 100 und 500 mM) eluiert. Dabei eluierte ein Teil mit 100 mM Imidazol und ein zweiter Teil mit 500 mM Imidazol. Ein Großteil des Nanogoldes® **17** verblieb sichtbar auf der Säule. Auch Elutionsversuche mit höheren Imidazolkonzentrationen oder EDTA waren erfolglos. Mit den erhaltenen Fraktionen wurde anschließend ein Pufferwechsel gegen HBS-Puffer im Roti®-Spin mini-Konzentrator (MWCO: 3 kDa, Carl Roth®; 14000 x g, *centrifuge* 5415R, Eppendorf) vorgenommen.

2. Methode: Nach 30 min wurden die überschüssigen Ni<sup>2+</sup>-Ionen und nicht umgesetztes Nanogold® **18** mittels Anionenaustauschchromatographie entfernt. Die Durchführung erfolgt analog zu IV.2.4, allerdings wurde ein linearer Gradient über 20 Säulenvolumen verwendet.

#### IV.2.2 Peptidmodifikationen mit Carboxy-*tris*NTA(*Ot*Bu)

Die für die Modifikation mit *tris*NTA vorgesehenen Peptide wurden auf der Festphase am automatisierten Peptidsynthesizer mittels Fmoc-Chemie<sup>191</sup> synthetisiert und zur Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(*Ot*Bu) (**1**) an den freien *N*-Terminus auf dem Harz belassen. Die Umsetzung erfolgte in einer Glassäule (Durchmesser ca. 1.5 cm) mit Fritte. Vor der Kupplung ließ man die Harze für mindestens 15 min im entsprechenden Lösungsmittel vorquellen und entfernte dieses anschließend. Für die Kupplung wurden die benutzten Kupplungsreagenzien direkt auf das Harz gegeben. Die Stoffe wurden in möglichst wenig Lösungsmittel gelöst und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit



dem Harz inkubiert. Anschließend wurde DIPEA zugegeben, und der Ansatz über Nacht, gegebenenfalls unter Lichtausschluss, bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

#### IV.2.2.1 Kupplung an Polyprolinpeptide

Die Polyprolinpeptide wurden am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie (Arbeitskreis Prof. Dr. Schwalbe, J.W. Goethe-Universität Frankfurt) auf ein säurelabiles Tritylchlorid-Polystyrol (TCP)-Harz gekuppelt. Die Seitengruppe des Cysteins war dabei durch eine ebenfalls säurelabile Trt-Schutzgruppe geschützt.

Die Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(O*t*Bu) (**1**) an die auf dem Harz gebundenen Peptide mit der Sequenz Harz-AC(Trt)P<sub>4,8,12</sub> erfolgte mittels Aktivesterchemie in NMP nach der Methode in **Tabelle 4**. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf jeweils 7.5 µmol reaktive Aminofunktionen auf dem Harz.

**Tabelle 4:** Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(O*t*Bu) (**1**) an die Polyprolinpeptide.

Schritt	Reagenz/ Lösungsmittel	äq.	Volumen <sup>a</sup> [µL]	Menge <sup>a</sup> [mg]	Zeit [h]
Quellen	NMP		500		¼
Kupplung	<b>1</b>	4		46.2	
	TBTU	4		9.6	
	HOBt	4		4.1	
	DIPEA	6.4	8.2	6.2	
	NMP		~ 200		16
Waschen	NMP		3x 1000		
	DMF		3x 1000		

<sup>a</sup>) Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 7.5 µmol reaktive Gruppen auf dem Harz.

Um die Vollständigkeit der Kupplung zu überprüfen, wurde mit wenigen Harzkügelchen ein Chloranil-Test (IV.2.2.3) durchgeführt. Bei einem negativen Testergebnis wurde das Peptid mittels Abspalllösung (IV.2.2.5) vom Harz abgespalten und gleichzeitig vollständig entschützt.

### IV.2.2.2 Kupplung an photolabile Histidin-Peptide

Die Synthese der photolabilen His-Peptide mit der Sequenz Harz-H(Trt)<sub>3</sub>-<sub>6</sub>GGGS(*t*Bu)AnpGGGS(*t*Bu)-C(*S*tBu)A bzw. mit C(Mmt) wurde von der Firma EMC microcollections (Tübingen) durchgeführt. Als Harz wurde ebenfalls ein säurelabiles TCP-Harz verwendet.

Das Carboxy-*tris*NTA(*O**t*Bu) (**1**) wurde manuell unter Lichtausschluss an den freien *N*-Terminus nach der in **Tabelle 5** angegebenen Methode gekuppelt. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf jeweils 15 µmol reaktive Gruppen auf dem Harz.

Die Kupplung wurde insgesamt dreimal wiederholt, wobei beim dritten Mal Mengen und Reaktionszeit reduziert wurden. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde an wenigen Harzkügelchen mittels KAISER-Test (IV.2.2.4) überprüft. Bei einem negativen oder sich nicht weiter verbessernden Testergebnis wurde das Peptid mittels Abspatlösung (IV.2.2.5) vom Harz abgespalten und gleichzeitig, abhängig von der verwendeten Cystein-Schutzgruppe, vollständig oder teilweise entschützt.

**Tabelle 5:** Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(*O**t*Bu) (**1**) an die photolabilen His-Peptide.

Schritt	Reagenz/ Lösungsmittel	äq.	Volumen <sup>a</sup> [µL]	Menge <sup>a</sup> [mg]	Zeit [h]
Quellen	DMF		500		¼
1./2. Kupplung	<b>1</b>	3		69.3	
	TBTU	3		14.5	
	HOBt	3		6.1	
	DIPEA	4.7	11.9	9.0	
	DMF		200		16
3. Kupplung	<b>1</b>	1		23.1	
	TBTU	1		4.8	
	HOBt	1		2.0	
	DIPEA	1.6	4.1	3.1	
	DMF		150		8
Waschen	DMF		5x 1000		

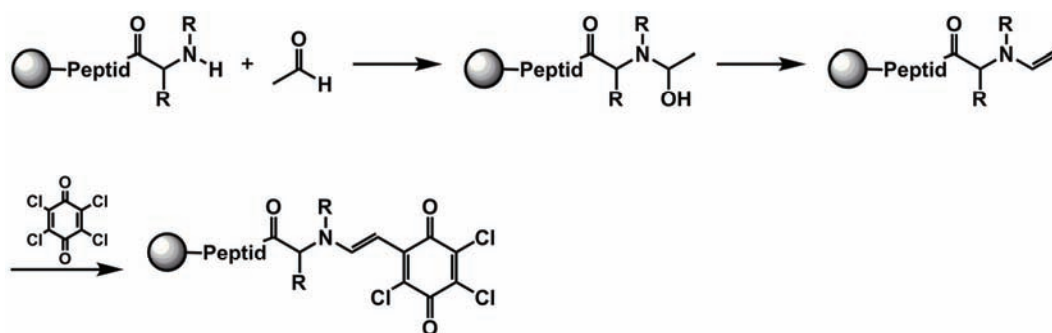
<sup>a</sup>) Die Menge beziehen sich auf 15 µmol reaktive Gruppen auf dem Harz.

### IV.2.2.3 Chloranil-Test

Im Gegensatz zum KAISER-Test (IV.2.2.4) kann der Chloranil-Test nicht nur bei primären, sondern auch bei sekundären Aminen eingesetzt werden<sup>192</sup>. In der Festphasenpeptidsynthese ist dies bei der Kupplung von Prolinen notwendig. Eine blaue Färbung der Harzkügelchen zeigt freie Amine an (**Abb. 9**).

Für den Chloranil-Test werden zwei Lösungen benötigt:

1. 2% Acetaldehyd in DMF
2. 2% Chloranil in DMF



**Abb. 9:** Nachweis von sekundären Aminen durch Chloranil.

Zu den Harzkügelchen wurden je zwei Tropfen jeder Lösung gegeben. Nach gutem Durchmischen wurde ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Neben der eigentlichen Probe wurden parallel immer auch eine Positiv- und Negativkontrolle bearbeitet.

### IV.2.2.4 Kaiser-Test

Der KAISER-Test wird eingesetzt, um primäre Amine nachzuweisen<sup>193</sup>. Besonders häufig wird er in der Festphasenpeptidsynthese genutzt, um die Kupplungseffizienz der einzelnen Kupplungsschritte zu überprüfen. Das bei dem Test eingesetzte Ninhydrin bildet mit freien primären Aminen das sogenannte RUHEMANNS-Blau, wodurch eine blaue Färbung der Harzkügelchen und der Lösung entsteht (**Abb. 10**). In Abwesenheit von primären Aminen verbleiben Harz und Lösung gelblich.

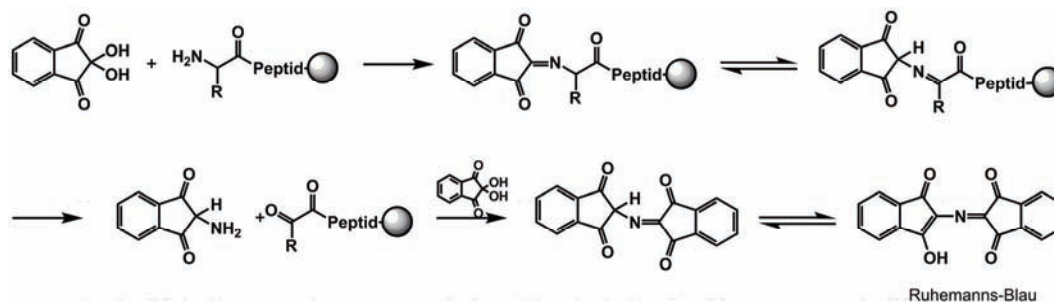


Abb. 10: Mechanismus zur Bildung von RUHEMANN'S-Blau.

Für den KAISER-Test werden drei verschiedene Lösungen benötigt:

1. Phenol, ~80% in Ethanol
2. KCN, in H<sub>2</sub>O/Pyridin
3. Ninhydrin, 6% in Ethanol

Zu den abgenommenen Harzkügelchen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden je zwei Tropfen von jeder Lösung gegeben. Es wurde gut gemischt und ca. 5 min auf 100°C erhitzt. Neben der zu testenden Probe wurden immer sowohl eine Positiv- als auch einen Negativprobe unter denselben Bedingungen getestet.

#### IV.2.2.5 Abspaltung und Aufarbeitung der *tris*NTA-Peptide

Nach erfolgreicher Kupplung des Carboxy-*tris*NTAs (**1**) an die unterschiedlichen Peptide auf dem Harz wurden diese mit einer Abspalllösung inkubiert (**Tabelle 6**). In Abhängigkeit von den benutzten Cystein-Schutzgruppen erfolgte gleichzeitig eine vollständige oder teilweise Entschützung der Seitenketten. Für das Cystein können verschiedene Schutzgruppen verwendet werden. Zum einen die säurelabilen Trt- und Mmt-Schutzgruppen, zum anderen die säurestabile *S*tBu-Schutzgruppe. Bei der Verwendung einer säurelabilen Schutzgruppe wurde eine Abspalllösung mit Ethandithiol (EDT) eingesetzt, um eine Reaktion der freien Thiolgruppen zu verhindern. Wurde die säurestabile *S*tBu-Schutzgruppe verwendet, so konnte auf EDT verzichtet werden. Es ist darauf zu achten, dass die Lösungen immer frisch angesetzt werden.

**Tabelle 6:** Zusammensetzungen der Lösungen für die Peptidabspaltung vom Harz.

	Cys(Trt)/ Cys(Mmt)	Cys( <i>St</i> Bu)
TFA	95%	96.25%
Phenol	1.25%	1.25%
TIPS	1.25%	1.25%
EDT	1.25%	-
Milli-Q-Wasser	1.25%	1.25%

Für die Abspaltung wurde das Harz für 4-5 h mit 600  $\mu$ L der entsprechenden Abspalllösung bei Raumtemperatur, bei den photolabilen His-Peptiden außerdem unter Lichtausschluss, unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde vom Harz abfiltriert und dieses mit wenig TFA gewaschen. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum bis fast zur Trockene entfernt. Die abgespaltenen Peptide wurden mit kaltem Diethylether auf Eis ausgefällt, abzentrifugiert und dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Der Ether wurde entfernt und das Ausfällen noch insgesamt zweimal wiederholt. Nach dem Trocknen erfolgte die Reinigung der Peptide mittels RP-HPLC mit einer C<sub>18</sub>-Säule (Vydac® 218TP, Grace) und Milli-Q-Wasser/Acetonitril mit 0.2% TFA als Laufmittel. Der verwendete Gradient wurde dem jeweiligen Peptid angepasst. Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und mittels MALDI- oder ESI-MS analysiert.

Peptide, bei denen das Cystein mit einer säurestabilen *St*Bu-Schutzgruppe geschützt war, wurden anschließend reduziert. Dazu wurde eine 5 mM Lösung des Peptids mit einem 15-fachen Überschuss an TCEP in Acetat-Puffer pH 5.0 für 16 h bei 40°C unter Schütteln und gegebenenfalls unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mittels RP-HPLC mit einer C<sub>18</sub>-Säule (Vydac® 218TP, Grace) gereinigt. Als Laufmittel wurden Milli-Q-Wasser und Acetonitril mit jeweils 0.2% TFA benutzt. Die Elutionsgradienten wurden dem entsprechenden Peptid angepasst. Eine Charakterisierung der gefriergetrockneten Fraktionen erfolgte mittels MALDI- oder ESI-MS.

Die für die Reinigungen der unterschiedlichen Peptide benutzten Gradienten sind in **Tabelle 7** dargestellt. Nach jedem Gradienten wurde die Säule mit 100% Acetonitril/0.2% TFA gespült, bevor auf die Startbedingungen zurückgekehrt wurde.

**Tabelle 7:** Benutzte Gradienten zur Reinigung der synthetisierten *tris*NTA-Peptide.

	Cys- Schutzgruppe	Säule	Gradient Acetonitril	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]
Polyprolin- Peptide	Trt	semipräp	0-30%	30	2
			30-100%	5	
photolabile	StBu	präp	0-35%	27	20
His-Peptide	Mmt	präp	0-30%	27	20

Die in dieser Arbeit synthetisierten *tris*NTA-Peptide sind in **Tabelle 8** und **Tabelle 9** zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der in dieser Arbeit synthetisierten Polyprolinpeptide.

	Nr.	Sequenz	Abkürzung
Polyprolinpeptide	<b>2</b>	<i>tris</i> NTA-PPPPCA	<i>tris</i> -4P
„ <i>tris</i> NTA-PPs“	<b>3</b>	<i>tris</i> NTA-PPPPPPPPCA	<i>tris</i> -8P
	<b>4</b>	<i>tris</i> NTA-PPPPPPPPPPPPCA	<i>tris</i> -12P

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der in dieser Arbeit synthetisierten photolabilen His-Peptide.

	Nr.	Sequenz	Abkürzung
photolabile His- Peptide	<b>37</b>	<i>tris</i> NTA-ACSGGGAnpSGGGHHH	<i>tris</i> -CAnpH <sub>3</sub>
	<b>38</b>	<i>tris</i> NTA-ACSGGGAnpSGGGHHHH	<i>tris</i> -CAnpH <sub>4</sub>
	<b>39</b>	<i>tris</i> NTA-ACSGGGAnpSGGGHHHHH	<i>tris</i> -CAnpH <sub>5</sub>
	<b>40</b>	<i>tris</i> NTA-ACSGGGAnpSGGGHHHHHH	<i>tris</i> -CAnpH <sub>6</sub>

#### IV.2.3 Fluoreszenzmarkierung von *tris*NTA-Peptiden

Die Modifikation der Peptide mit einem Fluorophor erfolgte über die freie Thiolgruppe der Cysteinseitenkette. Zu einer etwa 1 mM Peptidlösung in 20 mM HEPES, pH 7.0 wurden 1.2 äq. des entsprechenden Fluorophors in DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und

Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Reinigung mittels RP-HPLC mit einer semipräparativen oder analytischen C<sub>18</sub>-Säule (Vydac® 218TP, Grace).

**Tabelle 10:** Gradienten für die Reinigung der fluoreszenzmarkierten Peptide.

Nr.	Peptid	Gradient	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]
		Acetonitril		
<b>5-10</b>	<i>tris</i> -nP(ATTO565/OG488)	0-40%	40	2
	mit n = 4, 8, 12	40-100%	5	
<b>44-47</b>	<i>tris</i> -C(ATTO565) <i>Anp</i> H <sub>n</sub>	0-35%	28	1.5
	mit n = 3-6			

Als Laufmittel wurden Milli-Q-Wasser und Acetonitril mit 0.2% TFA verwendet. Der Gradient wurde dem jeweiligen Peptid und Fluorophor angepasst. Am Ende eines jeden Gradienten wurde mit 100% Acetonitril/0.2% TFA gespült, bevor die Säule wieder mit den Ausgangsbedingungen äquilibriert wurde.

#### IV.2.4 Beladen der Chelatorköpfe mit Nickelionen

Zum Beladen der NTA-Gruppen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen wurde für alle Verbindungen nach demselben Protokoll verfahren. Die fluoreszenzmarkierten Chelatorköpfe bzw. die mit Carboxy-*tris*NTA(*Ot*Bu) (**1**) modifizierten Peptide wurden mit einem 15- (*tris*NTA) bzw. 20-fachen (*tetrakis*NTA) Überschuss an Ni<sup>2+</sup>-Ionen in 10 mM Hepes, pH 7.0 für mindestens 30 min inkubiert. Zum Abtrennen der überschüssigen Ni<sup>2+</sup>-Ionen wurde eine Anionenaustauschchromatographie an einem ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare) oder ÄKTAprime System (GE Healthcare) durchgeführt. Die entsprechende Lösung wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine mit 10 mM Hepes, pH 7.0 voräquilibrierte *HiTrap*<sup>TM</sup> Q HP Säule (1 mL, GE Healthcare) aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde mit fünf Säulenvolumen Laufpuffer (2 mL/min) gewaschen. Im Falle der photolabilen His-Peptide wurde dann ein Waschschrift mit 5 mL EDTA (50 µM) bei einer Flussrate von 0.5 mL/min durchgeführt, um eventuell am His-*Tag* gebundene Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu entfernen. Abschließend erfolgte die Elution mit einer Flussrate von 1 mL/min durch einen linearen Gradienten von 0-100% Elutionspuffer über acht Säulenvolumen.

Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist unter VIII.1.3.3 zu finden.

## IV.2.5 Mikroskopieoberflächen mit P*A*trisNTA

Für die Herstellung der Glaschips mit *tris*-CANpH<sub>5</sub> (**39**) auf der Oberfläche wurden herkömmliche Mikroskopiedeckgläser (24 mm Durchmesser, 160-190 µm Dicke, Menzel) zunächst über Nacht in Piranha-Lösung (konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Verhältnis 2:1) gesäubert. Anschließend wurden sie mit Milli-Q-Wasser gewaschen und mit Stickstoff getrocknet. Für die folgenden Modifikationen wurden immer zwei Deckgläser mit den reaktiven Seiten zusammengebracht. Dadurch wurde eine gleichmäßige Oberflächenmodifikation erreicht. Die Schritte für die Herstellung der P*A*trisNTA-Oberflächen sind in **Tabelle 11** dargestellt. Nach jedem Schritt wurden die Deckgläser im Stickstoffstrom getrocknet.

**Tabelle 11:** Herstellung von P*A*trisNTA-Oberflächen für die Fluoreszenzmikroskopie.

Schritt	Substanz	Menge Konz.	Zeit [h]	T [°C]	Anschlussbehandlung
Silanisierung	GOPTS <sup>a</sup>	6 µL	1	75	Waschen mit Aceton und Milli-Q-Wasser
PEGylierung	DAPEG <sup>b</sup>	Feststoff schmelzen	über Nacht	75	Waschen mit Milli-Q-Wasser
Funktionalisierung	MPANHS <sup>c</sup>	konz. Lsg. in DMF	2	RT	Waschen mit CHCl <sub>3</sub>
Peptid	P <i>A</i> trisNTA in HBS	6 µL 500 µM	1	RT	Waschen mit Milli-Q-Wasser
Deaktivierung	Cystein in HBS	6 µL 50 mM	0.5	RT	Waschen mit Milli-Q-Wasser

<sup>a</sup>) (3-Glycidylxypropyl)-trimethoxysilan, <sup>b</sup>) Diaminopolyethylenglykol, <sup>c</sup>) 3-(Maleimido)propionsäure-NHS-Ester

## IV.2.6 Spaltung der photoaktivierbaren *tris*NTAs

### IV.2.6.1 Photoinduzierte Peptidspaltung in Lösung

Pro Ansatz wurden 0.3 mg AC(*St*Bu)SGGGAnpSGGGHHHHH (**42**) in 150 µL HBS-Puffer gelöst. Die Lösungen wurden in einer 24-*well* Platte auf Eis verschieden lange aus einem Abstand von ca. 1.5 cm mit Licht der Wellenlänge 366 nm bestrahlt (2x8 W, Benda). Anschließend wurden jeweils 100 µL der Lösung auf eine C<sub>18</sub>-Säule



(Vydac® 218TP, Grace) aufgetragen, um die Spaltung mittels RP-HPLC zu verfolgen. Dafür wurde ein linearer Gradient von 0-29% Acetonitril in Milli-Q-Wasser mit 0.2% TFA verwendet. Die Absorption wurde bei 220 nm und 270 nm gemessen. Die Fraktionen der einzelnen Peaks wurden vereinigt, gefriergetrocknet und mittels ESI-MS analysiert.

#### **IV.2.6.2 Komplexbildung zwischen P*A*trisNTAs und MBP-H<sub>6</sub>**

MBP-H<sub>6</sub> wurde mit den fluoreszenzmarkierten (IV.2.3) und Ni<sup>2+</sup>-beladenen (IV.2.4) P*A*trisNTAs in den angegebenen Konzentrationen und Verhältnissen in HBS-Puffer gemischt. Die Lösungen wurden in eine 96-*well* Platte auf Eis gegeben und verschieden lange aus einem Abstand von ca. 1.5 cm mit Licht der Wellenlänge 366 nm (2x8 W, Benda) bestrahlt. Anschließend wurde unterschiedlich lange im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert, um eine Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen. Als Kontrollen wurden Proben ohne Belichtung bei Raumtemperatur inkubiert. Die stabile Bindung der P*A*trisNTAs an den His<sub>6</sub>-*Tag* des MBPs wurde durch Gelfiltrationsläufe (IV.1.2.2) analysiert.

#### **IV.2.6.3 Photoinduzierte Peptidspaltung auf SPR-Oberflächen**

Zur Spaltung von *tris*-CAnpH<sub>5</sub> (**39**) auf der Oberfläche eines modifizierten SPR-Sensorchips (IV.3.5) wurde dieser auf Eis aus einem Abstand von ca. 1.5 cm mit Licht der Wellenlänge 366 nm (2x8 W, Benda) bestrahlt. Dabei wurde ca. alle 5 min der HBSE-Puffer (HBS-Puffer mit 50 µM EDTA) auf der Chipoberfläche gewechselt. Es wurden verschiedene Belichtungszeiten getestet. Nach jeder Belichtung wurde der Sensorchip in das BIAcore T100 Spektrometer (GE Healthcare) eingebaut, mit Laufpuffer äquilibriert, und die Proteinbindung an die Chipoberfläche mittels SPR wie unter IV.3.5 beschrieben analysiert.

#### **IV.2.6.4 Photoinduzierte Peptidspaltung auf Mikroskopieoberflächen**

##### **IV.2.6.4.1 Strukturierung mittels Maskenlithographie**

Zur Strukturierung der P*A*trisNTA-Oberflächen für die Fluoreszenzmikroskopie kann eine Chrom-Quarzglas-Maske mit einem beliebigen Muster verwendet werden.

Für die hier durchgeführten Versuche wurden Masken mit verschiedenen großen Gittermustern verwendet, welche in Linienabstand (25-100  $\mu\text{m}$ ) und -breite (1-10  $\mu\text{m}$ ) variierten. Die Maske wurde auf das mit **39** modifizierte Deckglas (IV.2.5) gelegt, wobei sich wenig HBSE-Puffer zwischen Deckglas und Maske befand. Mithilfe von Objektträgern wurde die Maske leicht auf die P $\text{Atris}$ NTA-Oberfläche gepresst. Die Belichtung erfolgte mit einer 200 W Hg(Xe) Bogenlampe (Newport Spectra-Physics) aus einem Abstand von ca. 4 cm. Die Lampe war mit einem dichroitischen Spiegel (Newport Spectra-Physics) ausgestattet, so dass nur Licht der Wellenlängen 280-400 nm auf die Probe traf. Durchgeführt wurde die Belichtung für 12 min. Anschließend wurde die Maske entfernt, und die Oberfläche nacheinander mit 1 M Imidazol (mind. 2 min) und 100 mM EDTA (mind. 2 min) inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen mit HBSE-Puffer wurden die *tris*NTA-Gruppen an der Oberfläche mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen (10 mM, mind. 5 min) beladen. Vor dem Immobilisieren des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Proteins wurde erneut mit HBSE-Puffer gewaschen.

#### IV.2.6.4.2 Strukturierung mittels Laserlithographie

Die orts aufgelöste Spaltung der P $\text{Atris}$ NTAs auf Glasoberflächen kann mit einem 405 nm Diodenlaser (25 mW) des CLSMs durchgeführt werden. Dazu wurden beliebige, inaktivierte Bereiche der Chipoberfläche mit dem Laserlicht bestrahlt. Dabei führten unterschiedliche Belichtungszeiten zu verschieden stark aktivierten Bereichen. Nach der Spaltung wurde die Oberfläche für 30 s mit 5 mM Imidazol inkubiert. Es folgten ein Waschschriff mit HBSE-Puffer und die Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten, His-getaggten Protein. Die Abbildung der Oberfläche mittels CLSM konnte sowohl *in situ* als auch unter HBSE-Puffer erfolgen.

#### IV.2.7 Präparation einer His<sub>6</sub>-Säule

Für die Reinigung des *tris*NTA-modifizierten Nanogolds® wurde eine Säule mit His-Tags auf der Oberfläche benötigt. Diese wurde mit *SulfoLink® Coupling Gel* (PIERCE) hergestellt, dessen Iodacetamidgruppen mit dem Peptid der Sequenz HHHHHHSGGGSGGGCG (EMC microcollections) umgesetzt wurden.

2 mL 50%-iges *SulfoLink® Coupling Gel* wurden in einen Säulenkörper (Handee™ *centrifuge columns*, 2 mL; PIERCE) gefüllt und mit 8 mL Tris-Puffer äquilibriert. 1 mg

Peptid wurde in 2 mL Tris-Puffer gelöst auf die Säule aufgetragen. Das Material wurde 15 min unter Schütteln und 1 h ohne Schütteln mit dem Peptid bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 3 mL Tris-Puffer gewaschen. 2 mL einer 50 mM Lösung von Cystein in Tris-Puffer wurden auf das Säulenmaterial gegeben, um eventuell verbliebene, reaktive Iodacetamidgruppen umzusetzen. Es wurde erneut 15 min unter Schütteln und 30 min ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Material mit 6 mL einer 1 M Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 5 mL HBSE-Puffer gewaschen und mit 10 mL HBS-Puffer äquilibriert. Gelagert wurde das Material bei 4°C unter 20% Ethanol.

Für die genaue Zusammensetzung der Lösungen siehe VIII.1.9.

## IV.3 Biophysikalische Methoden

### IV.3.1 UV/Vis Spektroskopie

Gemäß dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz kann die Konzentration eines absorbierenden Stoffes photometrisch bestimmt werden.

**Gleichung 3:** 
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit A: Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge  
 $\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient [L/mol·cm]  
c: Konzentration der absorbierenden Teilchen [mol/L]  
d: Schichtdicke [cm]

Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  muss dabei, wenn er nicht bekannt ist, für jeden Stoff bestimmt werden.

#### IV.3.1.1 Konzentrationsbestimmung der verwendeten Proteine

Ein charakteristisches Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Durch Bestimmung der Absorption bei diesem Maximum wird die Proteinkonzentration mithilfe von **Gleichung 3** bestimmt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine gelten folgende Extinktionskoeffizienten:

Proteasom:	$\varepsilon_{280} = 428400$	L/mol·cm
MBP:	$\varepsilon_{280} = 66350$	L/mol·cm

### IV.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von fluoreszenzmarkierten Substanzen

Liegen homogen markierte Substanzen mit bekannter Anzahl an Fluorophoren vor, so kann auch deren Konzentration mithilfe des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes (**Gleichung 3**) berechnet werden. Die Bestimmung erfolgt durch das Messen der Absorption beim Maximum des jeweiligen Fluorophors. Diese Art der Konzentrationsbestimmung wurde sowohl für die fluoreszenzmarkierten Chelatorköpfe als auch für die fluoreszenzmarkierten *tris*NTA-Peptide nach dem Beladen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen verwendet. Für die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore gilt laut Hersteller:

ATTO565:	abs <sub>max</sub> = 563 nm	ε <sub>563</sub> = 120000 L/mol·cm
Fluoreszein:	abs <sub>max</sub> = 495 nm	ε <sub>495</sub> = 75000 L/mol·cm
OregonGreen488:	abs <sub>max</sub> = 492 nm	ε <sub>492</sub> = 82800 L/mol·cm

Ein leichter Shift des Maximums aufgrund der Umsetzung des Fluorophors ist möglich. Die Absorption wurde immer beim gemessenen Maximum ermittelt.

### IV.3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nanogold®

Zur Bestimmung der Nanogold®-Konzentration nach der Umsetzung mit Thio-*tris*NTA (**19**) wurde ebenfalls die UV/Vis Spektroskopie benutzt. Für das Nanogold® gelten folgende Angaben:

$$\text{abs}_{\text{max}} = 420 \text{ nm} \quad \epsilon_{420} = 155000 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$$

### IV.3.1.4 Konzentrationsbestimmung der rigiden *bis*NTAs

Die Konzentrationen des Ni<sup>2+</sup>-beladenen Nitrophenyl-*ortho-bis*NTAs (**44**) und des Nitrobenzidin-*bis*NTAs (**45**) lassen sich über die charakteristischen Absorptionen der Moleküle bestimmen. Dazu wurde eine definierte Menge des unbeladenen Moleküls gelöst und ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Das Absorptionsmaximum, welches durch das aromatische Gerüst hervorgerufen wird, wurde bestimmt. Anschließend wurde eine Konzentrationsreihe angesetzt und spektroskopisch untersucht. Aus der Steigung der erhaltenen Gerade wurden die folgenden Extinktionskoeffizienten erhalten:

Nitrophenyl- <i>ortho-bis</i> NTA:	Abs <sub>max</sub> = 305 nm	ε <sub>305</sub> = 756 L/mol·cm
Nitrobenzidin- <i>bis</i> NTA:	Abs <sub>max</sub> = 375 nm	ε <sub>375</sub> = 1825 L/mol·cm

## **IV.3.2 Fluoreszenzspektroskopie**

### **IV.3.2.1 Aufnahme von Fluoreszenzspektren**

Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluorolog III (Horiba)- oder einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer (Varian) aufgenommen. Um ein Adsorbieren der fluoreszenten Substanzen an die Küvettenwand zu verhindern, wurde ein HBS-Puffer mit 0.01% Tween20 verwendet. Die Spaltbreiten wurden dabei den jeweiligen Konzentrationen angepasst. Der ATTO565-Farbstoff wurde bei 563 nm angeregt. Das Emissionsmaximum lag bei 592 nm. Für den OregonGreen488-Farbstoff wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm benutzt. Das Emissionsmaximum lag bei 515 nm.

Die *tris*NTA-PPs wurden in einer Konzentration von 20 nM am Fluorolog III (Horiba) eingesetzt. Es wurden sowohl Spektren als auch zeitabhängige Messungen durchgeführt. Für Spektren ohne Ni<sup>2+</sup>-Beladung der *tris*NTA-Gruppen wurden die Proben über Nacht mit 120 µM EDTA inkubiert und anschließend vermessen.

### **IV.3.2.2 Abbau von Fluoreszein-markiertem Casein**

Die Aktivität des 20S Proteasoms in Lösung kann durch den Abbau von Fluoreszein-markiertem Casein direkt verfolgt werden<sup>190</sup>. Im intakten Zustand kommt es bei dem Casein zu einer Selbstlöschung der Fluoreszenz aufgrund der vorhandenen Mehrfachmarkierung. Eine Spaltung des Caseins zwischen zwei Fluoreszeinmolekülen führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals und ermöglicht so den direkten Vergleich der jeweiligen Aktivitäten in Echtzeit.

Die 20S Proteasome wurden in einer Endkonzentration von 10 nM zu einer 100 nM Lösung von Fluoreszein-markiertem Casein in HBS-Puffer bei 60°C gegeben. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals wurde am Fluoreszenzspektrometer (Fluorolog III, Horiba) bei einer Emissionswellenlänge von 515 nm (Anregungswellenlänge: 495 nm) für 15 min verfolgt.

### **IV.3.2.3 Grundlagen der Fluoreszenztitration**

Die Bestimmung der Affinität zweier Reaktionspartner zueinander kann mithilfe der Gleichgewichtsfluoreszenztitration bestimmt werden. Dabei macht man sich die unterschiedlichen Emissionsintensitäten eines Fluorophors in verschiedenen

Umgebungen zu nutzen. Zu einer Lösung eines fluoreszenten Rezeptors R wird ein unmarkierter Ligand L pipettiert. Durch Bindung des Liganden an den Rezeptor ändert sich die Fluoreszenzintensität des Fluorophors. Meistens wird die Fluoreszenz des Fluorophors gequenchet, d.h. die Fluoreszenzintensität nimmt ab. Aus einer Auftragung der Intensität gegen die zunehmende Ligandenkonzentration kann die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Komplexbildung ermittelt werden.

Die Gleichgewichtsreaktion der Komplexbildung lässt sich wie folgt beschreiben (**Gleichung 4**):



Daraus ergibt sich für die Dissoziationskonstante  $K_D$ :

**Gleichung 5:** 
$$K_D = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]}$$

mit  $[R]$ : Konzentration des freien Rezeptors im Gleichgewicht  
 $[L]$ : Konzentration des freien Liganden im Gleichgewicht  
 $[RL]$ : Komplexkonzentration im Gleichgewicht

Für die Gleichgewichtskonzentrationen gilt jeweils:

**Gleichung 6:**  $[R] = [R]_0 - [RL]$

**Gleichung 7:**  $[L] = [L]_0 - [RL]$

mit  $[R]_0$ : Gesamtkonzentration des Rezeptors  
 $[L]_0$ : Gesamtkonzentration des Liganden

Durch Einsetzen in **Gleichung 5** erhält man:

**Gleichung 8:**

$$K_D = \frac{([R]_0 - [RL]) \cdot ([L]_0 - [RL])}{[RL]} = \frac{[R]_0[L]_0 - [RL][R]_0 - [RL][L]_0 + [RL]^2}{[RL]}$$

Umformen ergibt die folgende quadratische Gleichung:

**Gleichung 9:**  $0 = [R]_0[L]_0 - [RL] \cdot ([R]_0 + [L]_0 + K_D) + [RL]^2$

Auflösen von **Gleichung 9** nach der Komplexkonzentration im Gleichgewicht  $[RL]$  ergibt zwei mögliche Lösungen, wobei nur die Gleichung mit dem negativen Vorzeichen vor der Wurzel physikalisch sinnvoll ist:

**Gleichung 10:** 
$$[RL] = \frac{[R]_0 + [L]_0 + K_D}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[R]_0 + [L]_0 + K_D}{2}\right)^2 - [R]_0[L]_0}$$

Die gemessene Änderung der Fluoreszenzintensität ist proportional zum Bindungsgrad, der sich durch den Quotienten von  $[RL]$  und  $[R]_0$  beschreiben lässt. Die Proportionalitätskonstante ist in diesem Fall die maximale Intensitätsänderung  $\Delta F_{\max}$ , die unter Sättigungsbedingungen erreicht wird.

**Gleichung 11:** 
$$\Delta F = \Delta F_{\max} \cdot \frac{[RL]}{[R]_0}$$

mit  $\Delta F$ : Fluoreszenzänderung bei jedem einzelnen Titrationsschritt  
 $\Delta F_{\max}$ : maximale Fluoreszenzänderung in der Sättigung

Die Fluoreszenzintensität  $F$  bei jedem einzelnen Titrationsschritt lässt sich somit wie folgt beschreiben:

**Gleichung 12:** 
$$F = [F_0 + (F_{\max} - F_0)] \cdot \frac{[RL]}{[R]_0}$$

mit  $F$ : gemessenen Fluoreszenzintensität  
 $F_0$ : Fluoreszenzintensität des freien Rezeptors ohne Liganden  
 $F_{\max}$ : Fluoreszenzintensität in der Sättigung

Durch Einsetzen von **Gleichung 10** in **Gleichung 12** erhält man für die Bestimmung von  $K_D$ :

**Gleichung 13:**

$$F = [F_0 + (F_{\max} - F_0)] \cdot \frac{\frac{[R]_0 + [L]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[R]_0 + [L]_0 + K_D}{2}\right)^2 - [R]_0[L]_0}}{[R]_0}$$

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  wird die Fluoreszenzintensität  $F$  gegen die Gesamtkonzentration des Liganden  $[L]_0$  aufgetragen.

In der Praxis liegt die Gesamtkonzentration des Rezeptors  $[R]_0$  oft weit unterhalb des Wertes für die Dissoziationskonstante  $K_D$ . Dadurch ist die Konzentration des freien Liganden  $[L]$  im Vergleich zur Konzentration des freien Rezeptors  $[R]$  ziemlich hoch und kann als konstant angesehen werden. Das heißt, es gilt näherungsweise  $[L]_0 \approx [L]$ . Ausgehend vom Massenwirkungsgesetz (**Gleichung 5**) und **Gleichung 6** gilt dann:

**Gleichung 14:** 
$$K_D = \frac{([R]_0 - [RL]) \cdot [L]}{[RL]} = \frac{[R]_0[L] - [RL][L]}{[RL]}$$

Auflösen nach der Komplexkonzentration  $[RL]$  ergibt die Gleichung für die LANGMUIR-Isotherme:

**Gleichung 15:** 
$$[RL] = \frac{[R]_0[L]}{K_D + [L]}$$

Im Falle der Gleichgewichtsfluoreszenztitration entspricht die Komplexkonzentration bei jedem einzelnen Titrationschritt der jeweiligen Fluoreszenzintensität  $F$ , und die Gesamtkonzentration des Rezeptors  $[R]_0$  kann durch die Fluoreszenzintensität in der Sättigung  $F_{\max}$  ausgedrückt werden. Es gilt dann:

**Gleichung 16:** 
$$F = \frac{F_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]}$$

Wie vorher beschrieben wird die Fluoreszenzintensität  $F$  gegen die Ligandenkonzentration  $[L]$  aufgetragen. Zum Anpassen der berechneten Kurve an die Messdaten wurde die GraphPad Prism 5 Software benutzt.

#### IV.3.2.4 Durchführung von Fluoreszenztitrationen

800  $\mu$ L einer 20 nM Lösung des entsprechenden His-Tags (**30-35**) in HBS-Puffer mit 0.01% Tween20 wurden in einer rührbaren Küvette im Fluoreszenzspektrometer (Fluorolog III, Horiba) vorgelegt und auf 25°C äquilibriert. Zu der Lösung wurden die rigiden bisNTAs (Nitrophenyl-ortho-bisNTA (**44**) und Nitrobenzidin-bisNTA (**45**)) unter Rühren in steigender Konzentration zugegeben. In der Stammlösung (1 mM) der rigiden bisNTAs lag der entsprechende His-Tag ebenfalls mit einer Konzentration von 20 nM vor, damit Verdünnungseffekte ausgeschlossen werden konnten.

Nach jedem Titrationschritt (**Tabelle 12**) wurde gewartet, bis das Signal wieder einen konstanten Wert angenommen hatte. Die Anregungswellenlänge betrug 495 nm, die Emissionswellenlänge 515 nm. Jede Messung wurde dreimal wiederholt, woraus Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Titrationschritte berechnet wurden.

Zur Ermittlung der  $K_D$ -Werte wurde das normalisierte Quenchen gegen die Konzentration des jeweiligen bisNTAs aufgetragen. Als Wert für die Fluoreszenzintensität wurde der Mittelwert aus den letzten 20 Messpunkten vor erneuter Titration verwendet. Die so erhaltenen Kurven wurden mit einem hyperbolischen Fit



(**Gleichung 16**) ausgewertet, weil angenommen werden konnte, dass es sich um 1 zu 1 Wechselwirkungen handelte.

**Tabelle 12:** Titrationsschema für einen His-Tag mit einem bisNTA **44** oder **45**.

Titrationssmenge [ $\mu\text{L}$ ]	bisNTA [nM]	His-Tags pro bisNTA
0	0	
2	2.49	8.04
2	4.98	4.02
4	9.90	2.02
8	19.61	1.02
15	37.30	0.54
15	54.37	0.37
20	76.21	0.26
40	117.00	0.17
80	188.64	0.11
100	263.35	0.08
150	352.75	0.06
150	422.80	0.05

### IV.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

#### IV.3.3.1 CLS-Mikroskopie mit P*A*trisNTA-Oberflächen

Die Untersuchung der strukturierten P*A*trisNTA-Oberflächen erfolgte mittels CLSM. Es wurde ein CLS-Mikroskop der Firma Carl Zeiss (LSM 510) mit einem invertierten Mikroskopaufbau (Axiovert 200M) verwendet. Die strukturierten Oberflächen wurden mit fluoreszenzmarkiertem MBP beladen. Dabei wurde ein His<sub>6</sub>-getaggt MBP in einer Konzentration von 500 nM und ein His<sub>10</sub>-getaggt MBP in einer Konzentration von 200 nM in HBSE-Puffer eingesetzt. Nach dem Entfernen der ungebundenen Proteine wurden die strukturierten P*A*trisNTA-Oberflächen (IV.2.6.4) in eine selbstgebaute Flüssigkeitszelle eingebaut und unter HBSE entweder mit einem Plan-Apochromat 20x Objektiv (NA 0.75) oder einem Plan-Neofluar 40x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.3) abgebildet. Die Anregung des Alexa488-Farbstoffes

erfolgte mit einem Argonlaser (30 mW) bei 488 nm. Für ATTO565-markierte Proteine wurde ein Helium-Neon Laser (543 nm, 1 mW) verwendet.

#### IV.3.3.2 TIRF-Mikroskopie mit P*A*trisNTA-Oberflächen

Mithilfe der TIRF-Mikroskopie wurden strukturierte P*A*trisNTA-Oberflächen abgebildet, auf denen ein aktiver, His<sub>6</sub>-getaggtter Rezeptor immobilisiert wurde, der einen fluoreszenzmarkierten HRV2-Virus binden konnte. Der Rezeptor bestand aus fünf identischen Einheiten eines Lipoproteins sehr geringer Dichte (VLDL, *very low density lipoprotein*). Dieser war zur Verbesserung der Expression C-terminal an ein MBP fusioniert und trug N-terminal einen His<sub>6</sub>-Tag (MBP-V33333-H<sub>6</sub>). Der Rezeptor wurde in einer Konzentration von 500 nM mit einem MBP(Alexa488)-H<sub>6</sub> in einem molaren Verhältnis von 20:1 in HBSE-Puffer verdünnt. Die Oberfläche wurde über Nacht mit der Mischung inkubiert und anschließend gründlich mit HBSE-Puffer gewaschen. Nach einer Äquilibration mit HBS-Puffer der 2 mM CaCl<sub>2</sub> enthielt (HBS-Ca), wurde der Cy5-markierte HRV2 in HBS-Ca-Puffer für 2 h auf die Oberfläche gegeben. Die strukturierten Oberflächen wurden unter HBS-Ca-Puffer mittels TIRF-Mikroskopie abgebildet. Es wurde ein kombiniertes AFM/TIRF Mikroskop (DMI 6000 B, Leica Microsystems) mit einer selbstgebauten Flüssigkeitszelle benutzt. Die Abbildung erfolgte mit einem HCX Plapo 100x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.46). Der Alexa488-Farbstoff wurde mit einem 488 nm Laser angeregt, während der Cy5-Farbstoff mit einem 633 nm Laser (Laserquelle: AM TIRF MC, Leica Microsystems) angeregt wurde.

#### IV.3.4 Elektronenmikroskopie mit 20S Proteasomkomplexen

Das für die Elektronenmikroskopie verwendete Quantifoil®-Grid (Quantifoil Micro Tools) wurde zunächst mithilfe eines Plasmareinigers entladen. Anschließend wurden 3 µL der mittels analytischer Gelfiltration isolierten Proteasom/*tris*NTA(NG)-Komplexe unverdünnt auf das Grid gegeben. Unter Verwendung eines Vitrobot<sup>TM</sup> Systems (FEI) wurde das Grid in flüssigem Ethan schockgefroren. Anschließend wurde es bis zum Vermessen die gesamte Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Mikroskopie wurde an einem CM120 Transmissionselektronenmikroskop (Phillips) mit einer 60000-fachen Vergrößerung und einer Objektivöffnung von 40-50 µm durchgeführt.

### IV.3.5 Oberflächenplasmonresonanz mit P*A*trisNTA-Oberflächen

Die Bindung His-getaggtter Proteine an Oberflächen mit P*A*trisNTAs wurde mittels SPR mit einem BIAcore® T100 Spektrometer (GE Healthcare) untersucht. Zunächst erfolgte die kovalente Immobilisierung der P*A*trisNTAs **37-40** an eine carboxymethylierte Dextranmatrix auf einem CM5 Sensorchip (GE Healthcare). In einem Aktivierungsschritt wurden die Carboxylgruppen durch eine 1:1 Mischung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) in reaktive NHS-Ester überführt. Über diese Aktivester wurden durch eine Umsetzung mit 2-(2-Pyridinyldithio)ethanamin-hydrochlorid (PDEA) reaktive Disulfide eingeführt, welche mit den Cysteinen der P*A*trisNTAs reagieren konnten. Eine Veränderung der Injektionsdauer und/oder der P*A*trisNTA-Konzentration beeinflusste deren Dichte auf der Oberfläche. Abschließend wurden die Oberflächen, zur Deaktivierung verbliebener aktiver Disulfide, mit Cystein behandelt (**Tabelle 13**).

**Tabelle 13:** Kupplung der P*A*trisNTAs auf einen CM5 Sensorchip.

Kupplungsschritt	Lösung	Flussrate ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Zeit (min)
Oberflächen- aktivierung	0.4 M EDC in Milli-Q-Wasser 0.1 M NHS in Milli-Q-Wasser	10	2
Einführung Disulfid	80 mM PDEA in Na-Boratpuffer, pH 8.5	10	4
P <i>A</i> trisNTA- Kupplung	25-200 $\mu\text{M}$ P <i>A</i> trisNTA in Citratpuffer, pH 2.0	10	15
Deaktivierung	50 mM Cystein und 1 M NaCl in Acetatpuffer, pH 4.0	10	4

Zum Vergleich verschiedener Beladungsdichten wurden unterschiedlich hohe *tris*-C*an*pH<sub>5</sub>-Konzentrationen (**39**; 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) in drei Flusszellen gekuppelt. Zum Vergleich der vier verschiedenen P*A*trisNTAs **37-40** untereinander, wurde je ein Peptid pro Flusszelle mit einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  gekuppelt. Als Laufpuffer wurde ein HBS-Puffer mit 50  $\mu\text{M}$  EDTA und 0.05% Tween20 (HBSET) bei einer Flussrate von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  verwendet.

Nach erfolgreicher Kupplung bzw. nach erfolgter Belichtung wurden die P*A*trisNTA-Oberflächen zunächst dreimal für je 2 min mit Imidazol und EDTA gewaschen und mit Laufpuffer äquilibriert. Zur Bestimmung der Proteinbindung wurden verschiedene Injektionen zum Aktivieren der Oberfläche benötigt. Zunächst wurde bei 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  für je 2 min mit Imidazol und EDTA gespült, und anschließend wurden die *tris*NTA-Gruppen durch Injektion von 10 mM  $\text{Ni}^{2+}$  (2 min) beladen. Die Injektion der Proteinlösungen mit verschiedenen Konzentrationen erfolgte für 30 min bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Auch die Dissoziation wurde für 30 min bei einer Flussrate von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  beobachtet. Abschließend wurden die Oberflächen durch Waschen mit Imidazol und EDTA wieder regeneriert. Für jede Proteinkonzentration wurde ein kompletter Zyklus durchlaufen. Vor der ersten Proteininjektion wurden drei identische Zyklen mit Laufpuffer statt Proteinlösung zum Äquilibrieren der Oberfläche durchgeführt. Für die Bindungsstudien wurden MBP-H<sub>6</sub> und MBP-H<sub>10</sub> in Konzentrationen von 39 nM bis 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Außerdem wurde eine Konzentration doppelt injiziert, um die Reproduzierbarkeit der gemessenen Kurven zu überprüfen. Die erhaltenen Bindungskurven wurden durch Subtraktion von Kurven, die aus Experimenten ohne  $\text{Ni}^{2+}$ -Injektion erhalten wurden, korrigiert. Bei diesen Messungen war keine Proteinbindung detektierbar.

**Tabelle 14:** Ablauf eines SPR Bindungsexperiments.

Schritt	Injektion	Zeit [min]	Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]
Oberflächenpräparation	1 M Imidazol	2	10
	100 mM EDTA	2	10
$\text{Ni}^{2+}$ -Beladung	10 mM $\text{NiSO}_4$	2	10
Assoziation	39 nM - 10 $\mu\text{M}$ MBP-H <sub>6/10</sub>	30	5
Dissoziation	-	30	10
Oberflächenregeneration	1 M Imidazol	2	10
	100 mM EDTA	2	10

## V ERGEBNISSE

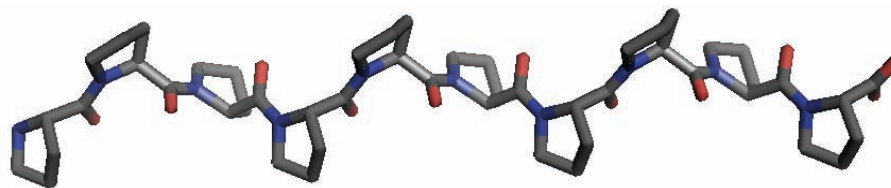
### V.1 Fluoreszente *tris*NTAs mit verbesserter Quantenausbeute

#### V.1.1 Hintergrund

Die von den Gruppen Piehler und Tampé entwickelten MCHs wurden erfolgreich für die Markierung von His-*getaggt*en Proteinen eingesetzt. Die fluoreszenten Verbindungen nehmen dabei eine Sonderstellung ein, weil über sie die Charakterisierung der Verbindungen in Lösung mittels Größenausschlusschromatographie, *stopped flow*- und ITC-Messungen erfolgte<sup>94</sup>. Durch den Einsatz in FRET-Studien konnten außerdem induzierte Konformationsänderungen in Proteinen genauer untersucht werden<sup>96,98</sup>.

In den Studien wurde beobachtet, dass das Fluoreszenzsignal durch das Beladen der NTA-Gruppen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen stark gequenchet wurde. Erklären ließ sich dies durch einen strahlungslosen Elektronen- und Energietransfer (FRET) auf die Metallionen<sup>99-103</sup>. Um diesen Effekt signifikant zu reduzieren, sollte eine räumliche Trennung von MCH und Fluorophor erfolgen. LATA et al. verwendeten hierzu Oligoethylenglykol als Abstandshalter und konnten das Quenchen eines OregonGreen 488-Derivats auf diese Weise von etwa 50% auf 30% reduzieren<sup>98</sup>. Durch die hohe Flexibilität des Oligoethylenglykols konnten aber weiterhin Stöße zwischen dem Ni<sup>2+</sup>-beladenen MCH und dem Fluorophor stattfinden, was ebenfalls eine Reduktion der Fluoreszenzintensität zur Folge hatte. Aus den beschriebenen Untersuchungen konnten gefolgert werden, dass bei der Wahl eines geeigneten Abstandshalters nicht nur dessen Länge, sondern auch dessen Flexibilität und Biokompatibilität wichtige Parameter darstellen.

Als rigide Abstandshalter in biochemischen Studien wurden oftmals Polyprolinpeptide eingesetzt<sup>194-198</sup>. Von Polyprolinen (PPs) ist bekannt, dass sie in wässrigen Lösungen eine stabile, relativ starre und dennoch einigermaßen lösliche helikale Struktur, die Polyprolin II (PPII) Helix, ausbilden (**Abb. 11**)<sup>199,200</sup>. Die PPII Helix ist eine linksgängige *all-trans* Helix mit genau drei Aminosäureresten pro Windung und einer Steighöhe von etwa 9 Å. Da bei der PPII Helix keine intramolekularen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können, erfolgt die Stabilisierung über intermolekulare Wasserstoffbrücken mit dem umgebenden Wasser.



**Abb. 11:** Abbildung einer linksgängigen Polyprolin II Helix.

STRYER et al. nutzen starre PPII Helices mit bis zu 12 Prolinen bereits 1967 als „spektroskopische Lineale“ in FRET-Studien<sup>201</sup>. Sie konnten damit experimentell den Zusammenhang zwischen einem Energietransfer und der 6. Potenz des Abstandes zwischen zwei Fluorophoren ( $E_T \sim R^6$ ) nach FÖRSTER bestätigen. Neuere Studien von SCHULER et al. haben ergeben, dass die Flexibilität der PPII Helix mit zunehmender Anzahl an Prolinen ebenfalls zunimmt<sup>202</sup>. Dies führt dazu, dass ab einer Länge von über 12 Prolinen die Relation  $E_T \sim R^6$  nicht mehr gilt. Ursache hierfür ist, dass *N*- und *C*-Terminus des Peptides in räumliche Nähe zueinander kommen können.

Die Idee in diesem Projekt war, mithilfe von Polyprolinsequenzen (4P, 8P und 12P) den Zusammenhang zwischen der Quantenausbeute eines Fluorophors und dessen Abstand zu einer  $\text{Ni}^{2+}$ -beladenen *tris*NTA-Gruppe systematisch zu untersuchen. Neben dem gewünschten, variablen Abstand ist damit auch die benötigte Biokompatibilität der Verbindungen gewährleistet. Unter der Annahme, dass eine PPII Helix ausgebildet wird, ergeben sich die folgenden Abstände zwischen *tris*NTA und Fluorophor:

**Tabelle 15:** Längen der als Abstandshalter eingesetzten Polyprolin II Helices.

Proline	Länge [Å]
4	12
8	24
12	36

Zu Beginn des Projektes musste zunächst die bisher nicht bekannte Synthese der verschiedenen fluoreszenten *tris*NTA-PP-Peptide etabliert werden. Anschließend sollte die Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren untersucht werden. Abschließend war geplant, den Nutzen der *tris*NTA-

PPs für die Charakterisierung His-*getaggt* Proteine in praktischen Anwendungen zu demonstrieren.

## V.1.2 Ergebnisse und Diskussion

### V.1.2.1 Synthese der *tris*NTA-Polyprolinpeptide

Die Polyprolinpeptide hatten die allgemeine Sequenz P<sub>n</sub>CA mit n = 4, 8, 12 und wurden mittels Fmoc-Chemie<sup>191</sup> an einem automatisierten Peptidsynthesizer dargestellt.

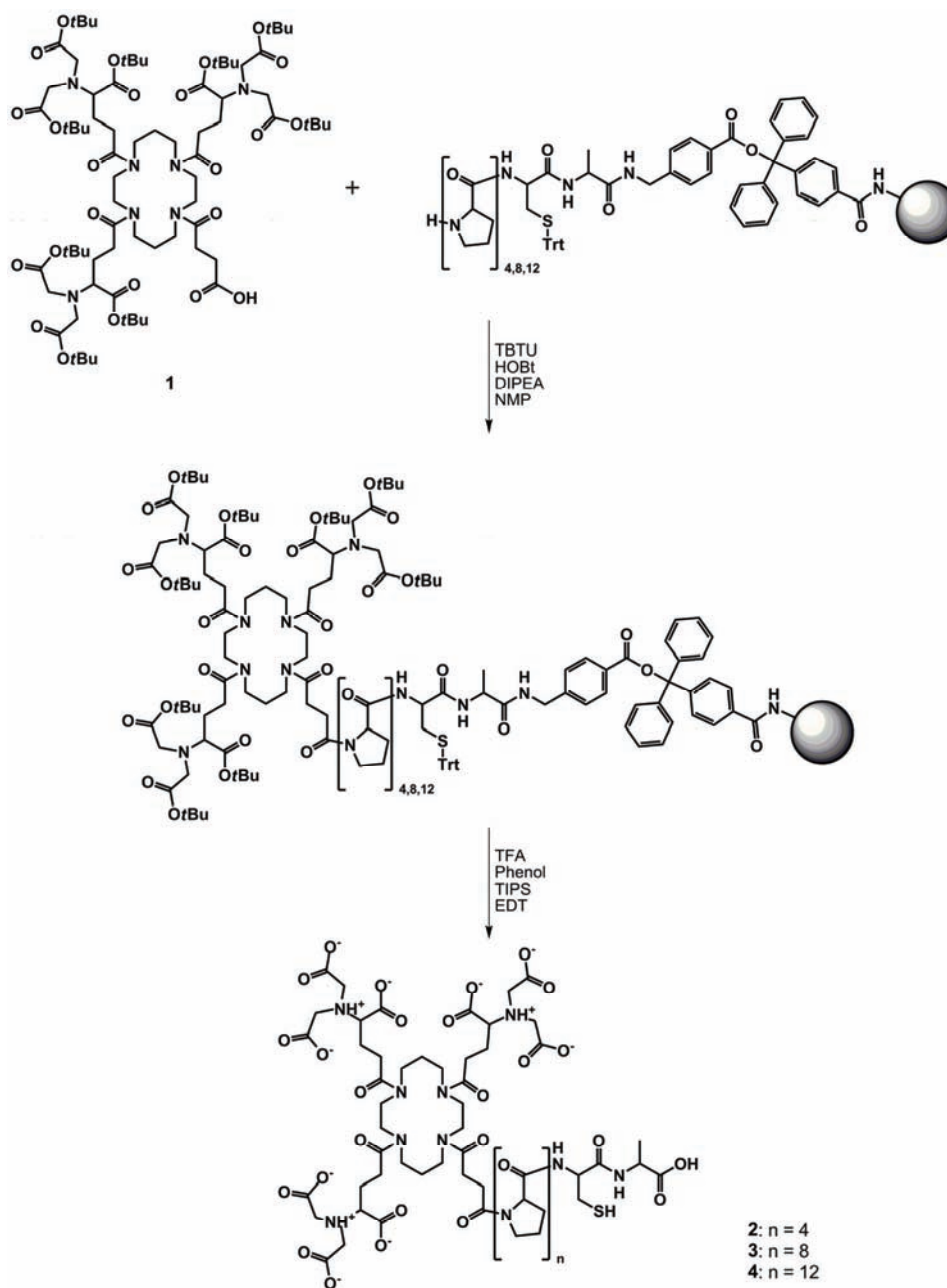
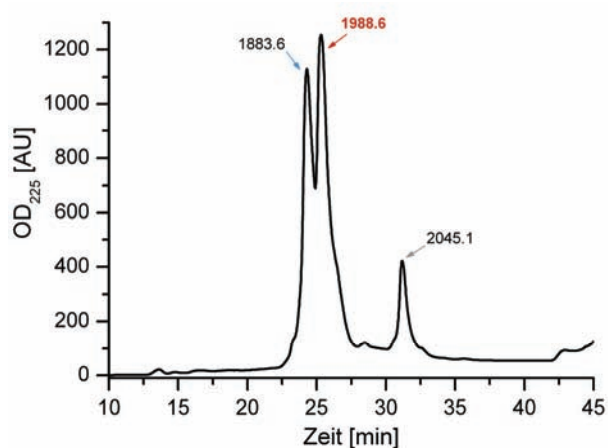


Abb. 12: Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(OtBu) (1) an die verschiedenen Polyprolinpeptide auf dem Harz.

Die synthetisierten PPs verfügten C-terminal über ein Cystein, welches für die spezifische Modifikation mit einem Fluorophor genutzt werden sollte. N-terminal sollte die *tris*NTA-Gruppe eingeführt werden. Daher wurden die Peptide für die manuelle Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(*Ot*Bu) (**1**) auf dem Harz belassen (**Abb. 12**). Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mit dem Chloranil-Test, welcher sekundäre Amine nachweist, überprüft. Bei einem positiven Testergebnis wurde die Kupplung von **1** wiederholt. Wurde ein negatives Testergebnis erhalten, so wurde das Peptid vom Harz abgespalten, vollständig entschützt und mittels RP-HPLC gereinigt. Für die drei verschiedenen Peptide **2-4** wurden jeweils sehr ähnliche Elutionsprofile erhalten (**Abb. 13**; Reinigung von *tris*NTA-P<sub>8</sub>CA (**3**)). Ihre Charakterisierung erfolgte durch anschließende MALDI-MS.



**Abb. 13:** RP-HPLC Chromatogramm der Reinigung von *tris*NTA-P<sub>8</sub>CA (**3**). Die Zahlen geben die Molekülmassen an, die mittels MALDI-MS bestimmt wurden. Die drei Hauptpeaks konnten dem gewünschten Produkt (roter Pfeil), dem Produkt ohne Cystein (blauer Pfeil) und einem einfach *t*Bu-geschützten Produkt (grauer Pfeil) zugeordnet werden.

Tabelle 16 gibt die in dieser Arbeit dargestellten *tris*NTA-PPs (**2-4**) noch einmal wieder.

**Tabelle 16:** Theoretische und bestimmte Molekulargewichte der synthetisierten *tris*NTA-PPs.

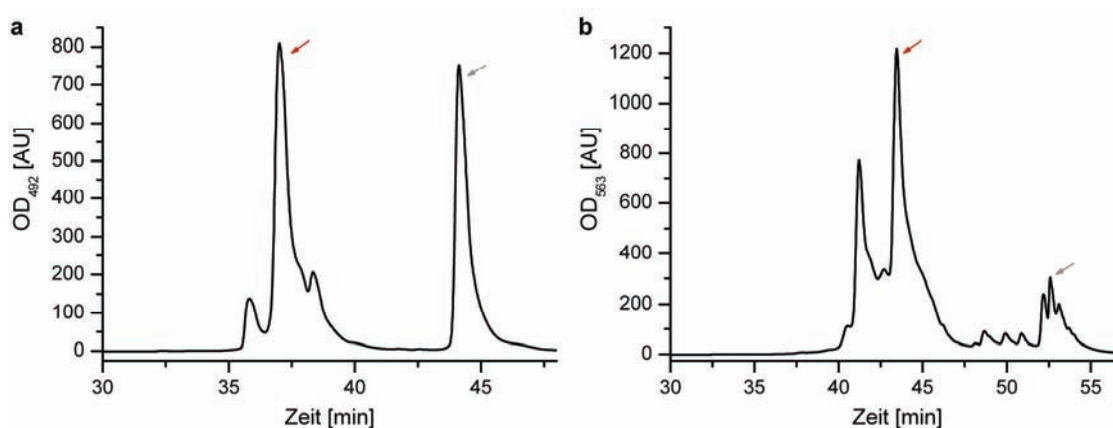
Nr.	Anzahl Proline	Summenformel	MW <sub>ber.</sub>	MALDI-MS [ <i>m/z</i> ]
<b>2</b>	4	C <sub>67</sub> H <sub>99</sub> N <sub>13</sub> O <sub>30</sub> S	1598.6	1600.7
<b>3</b>	8	C <sub>87</sub> H <sub>127</sub> N <sub>17</sub> O <sub>34</sub> S	1987.1	1988.6
<b>4</b>	12	C <sub>107</sub> H <sub>155</sub> N <sub>21</sub> O <sub>38</sub> S	2375.6	2376.5

Für jedes der drei *tris*NTA-PPs **2-4** wurden neben dem gewünschten Produkt zwei Nebenprodukte identifiziert. Zum einen ein Peptid, in welchem das Cystein aufgrund



eines Kupplungsfehlers während der Festphasensynthese fehlte (-105 g/mol). Dies sollte durch eine verbesserte Kontrolle der einzelnen Kupplungsschritte zu verhindern sein. Zum anderen wurde ein Peptid detektiert, bei dem es während der Entschützung zu einer Reaktion zwischen der Thiofunktion des Cysteins und einer abgespaltenen *t*Bu-Gruppe gekommen war (+57 g/mol). Die dabei entstandene *St*Bu-Gruppe ist sehr stabil und wäre nur schwer zu spalten gewesen. Durch die Verwendung von EDT während der Entschützung oder den Einsatz einer säurestabilen Schutzgruppe für das Cystein ließe sich eine solche Nebenreaktion verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Optimierung nicht mehr durchgeführt, weil die geplanten Untersuchungen mit den bereits dargestellten Peptiden durchgeführt werden konnten.

Die *St*Bu-modifizierte Peptide ließen sich leicht von den gewünschten *tris*NTA-PPs **2-4** abtrennen, während die Peptide ohne Cystein ein den Produkten sehr ähnliches Laufverhalten zeigten. Auf eine vollständige Reinigung von **2-4** wurde aber verzichtet, weil die Peptide ohne Cystein in der anschließenden spezifischen Modifikation mit einem Maleimid-Farbstoff nicht reagieren und während der anschließenden Reinigung abgetrennt werden konnten. Für die Markierung mit einem Fluorophor wurden in dieser Arbeit ein ATTO565- und ein OregonGreen488 (OG488)-Farbstoff verwendet. Nach der Umsetzung erfolgten die Reinigung mittels RP-HPLC und die Charakterisierung mittels MALDI- oder ESI-MS (**Abb. 14**). Aus den Chromatogrammen ist zu erkennen, dass sich die markierten Peptide leicht von nicht umgesetztem Farbstoff abtrennen ließen.



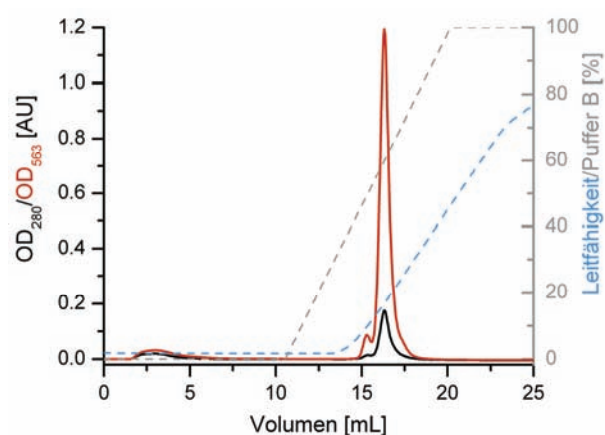
**Abb. 14:** RP-HPLC Chromatogramme der fluoreszenzmarkierten *tris*NTA-PPs **7** und **8**. Reinigung von OregonGreen488- (**a**) und ATTO565- (**b**) markiertem *tris*NTA-P<sub>8</sub>CA. Die Detektion erfolgte bei 492 bzw. 563 nm. Die roten Pfeile markieren die Produkte, die grauen Pfeile nicht umgesetzten Farbstoff.

In **Tabelle 17** sind die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und fluoreszenzmarkierten *tris*NTA-PPs (**5-10**) noch einmal zusammengefasst.

**Tabelle 17:** Theoretische und bestimmte Molekulargewichte der fluoreszenzmarkierten *tris*NTA-PPs.

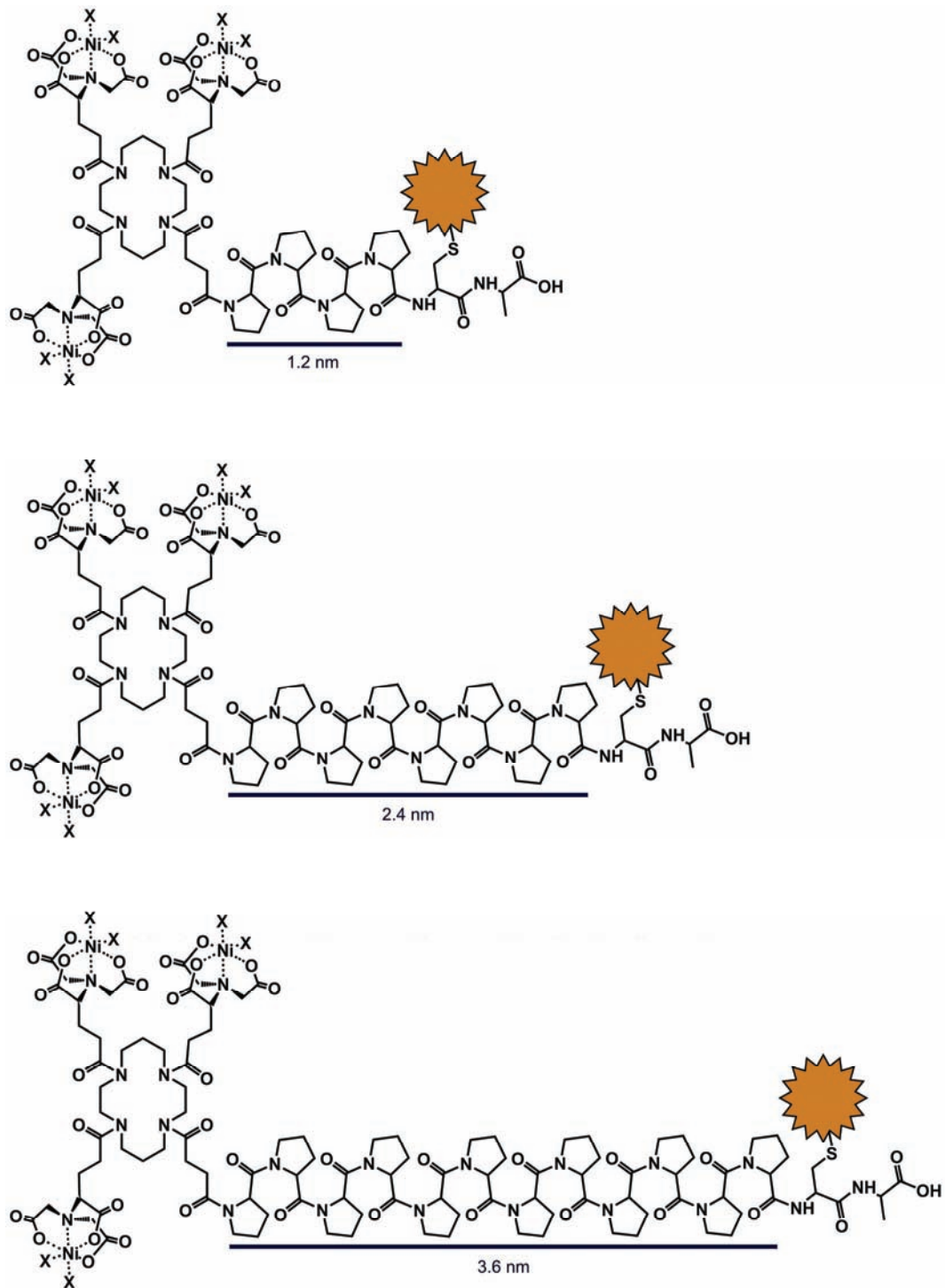
Nr.	Proline	Farbstoff	Summenformel	MW <sub>ber.</sub>	MS [ <i>m/z</i> ]
<b>5</b>	4	OG488	C <sub>91</sub> H <sub>110</sub> F <sub>2</sub> N <sub>14</sub> O <sub>37</sub> S	2061.9	2061.4
<b>6</b>		ATTO565	C <sub>104</sub> H <sub>136</sub> N <sub>17</sub> O <sub>36</sub> S <sup>+</sup>	2232.4	2229.3
<b>7</b>	8	OG488	C <sub>111</sub> H <sub>138</sub> F <sub>2</sub> N <sub>18</sub> O <sub>41</sub> S	2450.4	2450.4
<b>8</b>		ATTO565	C <sub>124</sub> H <sub>164</sub> N <sub>21</sub> O <sub>40</sub> S <sup>+</sup>	2620.8	2617.4
<b>9</b>	12	OG488	C <sub>131</sub> H <sub>166</sub> F <sub>2</sub> N <sub>22</sub> O <sub>45</sub> S	2838.9	2839.2
<b>10</b>		ATTO565	C <sub>144</sub> H <sub>192</sub> N <sub>25</sub> O <sub>44</sub> S <sup>+</sup>	3009.3	3010.7

Zum Beladen der NTA-Gruppen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen, wurden die Polyprolinpeptide **5-10** mit einem Überschuss an Ni<sup>2+</sup>-Ionen inkubiert. Überschüssige Ni<sup>2+</sup>-Ionen wurde nach 30 min durch eine Anionenaustauschchromatographie entfernt (**Abb. 15**).



**Abb. 15:** Elutionsprofil einer Anionenaustauschchromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-beladenem *tris*NTA-P<sub>8</sub>C(ATTO565)A (**8**).

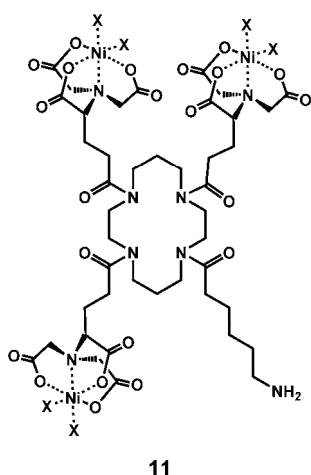
Die Konzentration der Ni<sup>2+</sup>-beladenen Verbindungen erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie über die charakteristische Absorption des verwendeten Fluorophors. In **Abb. 16** sind die Strukturformeln der Ni<sup>2+</sup>-beladenen *tris*NTA-P<sub>n</sub>CAs (n = 4, 8, 12) dargestellt. In nm angegeben sind die Abstände zwischen dem *tris*NTA und dem jeweiligen Fluorophor (**Abb. 16**; roter Stern). Die Abstandsangaben sind unter der Annahme gemacht, dass die Polyproline eine PPII Helix ausbilden.



**Abb. 16:** Strukturformeln der Ni<sup>2+</sup>-beladenen *tris*NTA-PPs mit 4, 8 und 12 Prolinen. Schematisch als roter Stern dargestellt ist ein frei wählbarer Fluoreszenzfarbstoff, der an das Cystein gekuppelt werden kann. Im Rahmen und dieser Arbeit wurden ein ATTO565- und ein OregonGreen488-Farbstoff verwendet. Die Längenangaben beziehen sich auf die sich bildenden Polyprolin II Helices. X = Wasser oder Histidin.

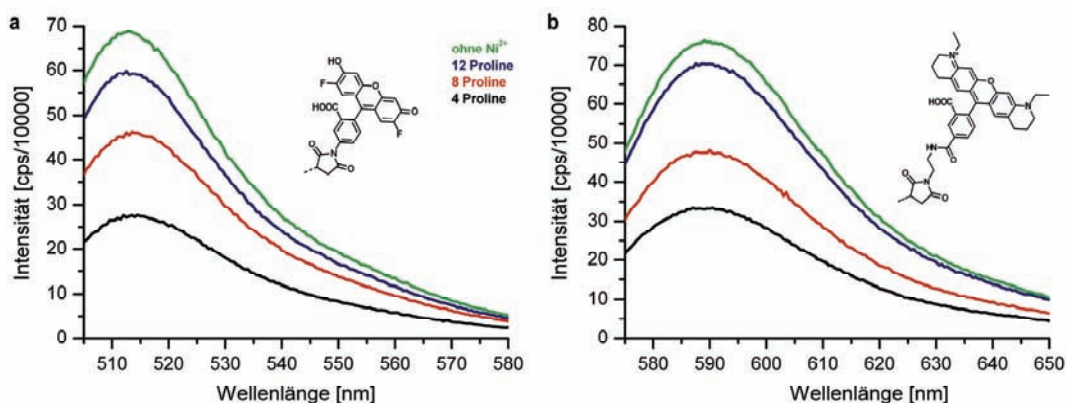
### V.1.2.2 Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten

Die Charakterisierung der OregonGreen488- und ATTO565-markierten *tris*NTA-PPs **5-10** erfolgte zunächst mittels Fluoreszenzspektroskopie. Dabei sollte untersucht werden, ob die starre PPII Helix einen positiven Einfluss auf die Quantenausbeute der Verbindungen hatte. Außerdem galt es zu ermitteln, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und dem Abstand gab. Als Vergleichssubstanzen ohne Proline wurden entsprechend fluoreszenzmarkierte Aminocapronsäure-*tris*NTA (**11**)-Derivate verwendet, bei denen der Farbstoff über einen kurzen, flexiblen Linker gekuppelt war (**Abb. 17**).



**Abb. 17:** Aminocapronsäure-*tris*NTA (**11**). Die Aminofunktion wurde verwendet, um Fluorophore spezifisch zu koppeln. X = Wasser oder Histidin.

Aus den aufgenommenen Fluoreszenzspektren der  $\text{Ni}^{2+}$ -beladenen *tris*NTA-PPs **5-10** war deutlich zu erkennen, dass die Intensität für beide Farbstoffe mit steigender Anzahl an Prolinen systematisch zunahm (**Abb. 18**). Für den Referenzwert wurden die  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen durch die Zugabe von EDTA aus dem *tris*NTA entfernt. Es wurde beobachtet, dass die Fluoreszenzintensität für die  $\text{Ni}^{2+}$ -unbeladenen *tris*NTA-PPs **5-10** unabhängig von der Anzahl der Proline war und für alle Konstrukte anstieg. Im Vergleich der beiden benutzten Farbstoffe war der Effekt, den die Proline auf die Fluoreszenzintensität hatten, für den ATTO565-Farbstoff stärker ausgeprägt als für den OregonGreen488-Farbstoff. Durch die Rotverschiebung des ATTO565-Farbstoffs im Vergleich zum OregonGreen488-Farbstoff tritt hier eine weniger starke Fluoreszenzlöschung auf. Mit 12 Prolinen wurde so eine Fluoreszenzintensität von etwa 90% im Vergleich zum  $\text{Ni}^{2+}$ -freien ATTO565-Derivat erreicht. Beim OregonGreen488-Farbstoff konnte die Fluoreszenzlöschung um einen Faktor von vier verringert werden (**Tabelle 18**).

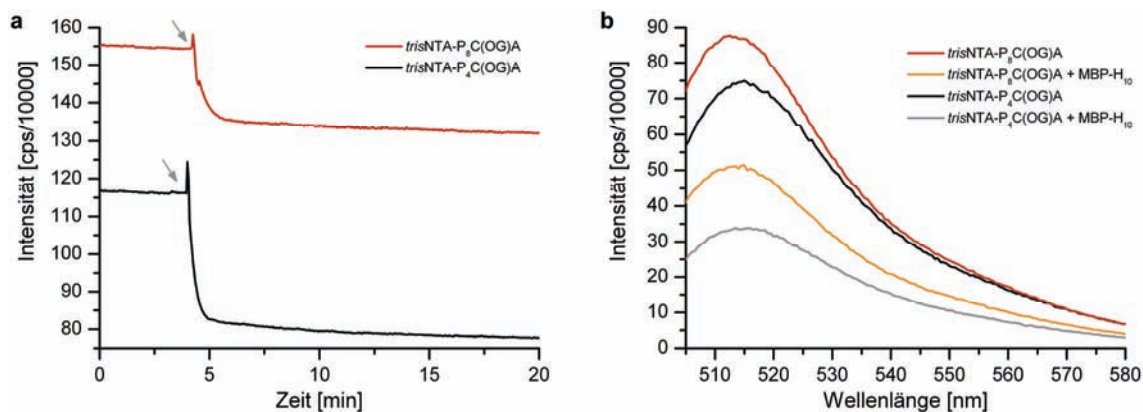


**Abb. 18:** Fluoreszenzspektren der fluoreszenzmarkierten *tris*NTA-PPs **5-10**. Ni<sup>2+</sup>-beladene, OregonGreen488- **(a)** und ATTO565- **(b)** markierte Peptide mit 4 (schwarz), 8 (rot) und 12 (blau) Prolinen. Als Referenz ohne Ni<sup>2+</sup>-Beladung, d.h. in Anwesenheit von EDTA (grün), ist das jeweilige Peptid mit 12 Prolinen dargestellt.

**Tabelle 18:** Ausmaß der durch die Ni<sup>2+</sup>-Beladung hervorgerufene Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von der Anzahl der Proline und des gewählten Fluoreszenzfarbstoffes.

Anzahl Proline	Fluoreszenzlöschung [%]	
	OG488	ATTO565
0	53	82
4	45	48
8	25	18
12	13	9

Es ist bekannt, dass die Intensität fluoreszenzmarkierter *tris*NTAs nicht nur durch das Beladen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen gequenchet wird, sondern auch durch das anschließende Komplexieren eines Proteins über dessen His-Tag<sup>98</sup>. Daher wurden exemplarisch die OregonGreen488-markierten *tris*NTA-PPs mit vier und acht Prolinen (**5**, **7**) auf diesen Einfluss hin untersucht. Aufgenommen wurden Fluoreszenzspektren ohne und mit einem 10-fachen Überschuss an MBP-H<sub>10</sub> (**Abb. 19**).



**Abb. 19:** Einfluss der Komplexierung von MBP-H<sub>10</sub> auf die Fluoreszenzintensität von *tris*NTA-P<sub>4</sub>C(OG)A (5) (schwarze Kurven) und *tris*NTA-P<sub>8</sub>C(OG)A (7) (rote Kurven). **(a)** Die Zugabe von MBP-H<sub>10</sub> (graue Pfeile) führt zu einer direkten Abnahme der Fluoreszenzintensitäten. **(b)** Fluoreszenzspektren vor (dunkle Linien) und nach (helle Linien) der Zugabe eines 10-fachen molaren Überschusses an MBP-H<sub>10</sub> zu 5 (schwarz/grau) und 7 (rot/orange).

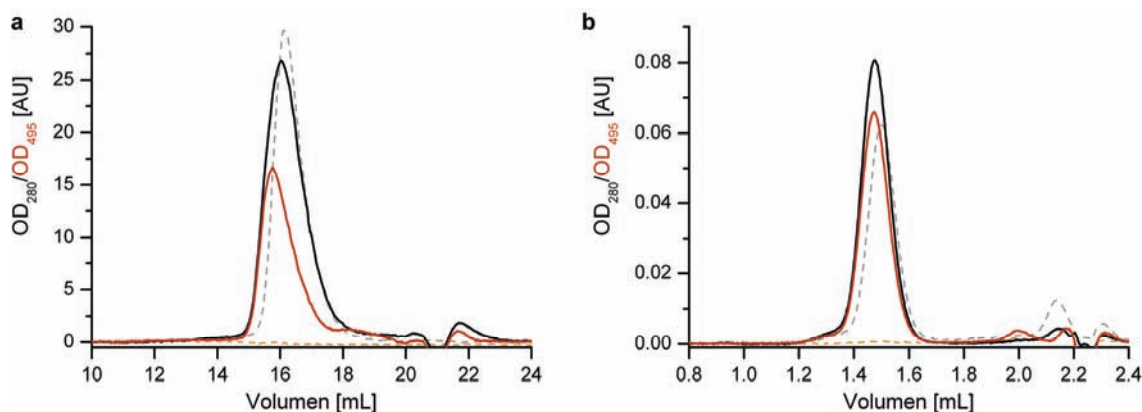
Wurde die Fluoreszenzintensität vor und nach der Zugabe von MBP-H<sub>10</sub> über die Zeit aufgezeichnet, so wurde deutlich, dass eine Intensitätsabnahme sofort nach Zugabe des MBPs eintrat. Allerdings wurde nicht sofort ein stabiler Wert erreicht. Um eine Gleichgewichtseinstellung zu garantieren, wurden die Proben für 16 h inkubiert. Aus den dann aufgenommenen Spektren war ersichtlich, dass es bei dem Peptid mit vier Prolinen zu einem Fluoreszenzquenching von 55% kam, wohingegen nur 41% für das Peptid mit acht Prolinen beobachtet wurden. Die Anzahl der Proline hat somit auch einen positiven Einfluss auf das Quenchen des Fluorophors, welches durch das spezifische Binden eines Proteins über dessen His-Tag hervorgerufen wird.

Die Verwendung von Polyprolinen als starre, in der Länge variable, rigide Abstandshalter hat sich als äußerst praktikabel herausgestellt. Auf diese Weise gelang es erstmals erfolgreich, die Intensität eines Fluorophors in Abhängigkeit vom Abstand zu einer Ni<sup>2+</sup>-beladenen *tris*NTA-Gruppe systematisch zu untersuchen. Die eindeutige Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Linkerlänge zeigte, dass das Quenchen größtenteils durch FRET auf die Ni<sup>2+</sup>-Ionen hervorgerufen wurde. Dagegen wäre bei einem Stoßquenchen zu erwarten gewesen, dass die Fluoreszenzintensität bereits mit vier Prolinen ihr Maximum zumindest nahezu erreicht hätte.

### V.1.2.3 Stabile Komplexierung His-getaggtter Proteine

Für eine mögliche Anwendung musste untersucht werden, ob sich die *tris*NTA-PPs **5-10** in ihren Bindungseigenschaften wie die *tris*NTAs ohne starre Abstandhalter verhielten. Als Proteine wurden sowohl His-getaggttes 20S Proteasom, als auch MBP-H<sub>6</sub> eingesetzt. Die Komplexbildung zwischen den Proteinen und den Ni<sup>2+</sup>-beladenen, fluoreszenzmarkierten *tris*NTA-PPs wurde exemplarisch mit **7** bzw. **9** mittels Gelfiltration analysiert (**Abb. 20**).

Bei der Gelfiltration wird eine stabile Komplexbildung zwischen einem His-getaggtten Protein und einem fluoreszenten *tris*NTA-Derivat durch zwei Merkmale deutlich: (i) der Elutionspeak des Proteins zeigt neben der Absorption bei 280 nm eine weitere Absorption bei der für den gewählten Fluorophor charakteristischen Wellenlänge; (ii) der Elutionspeak des markierten Proteins ist aufgrund der Größenzunahme zu einem geringeren Volumen (V) verschoben. Die durchgeführten Gelfiltrationen mit *tris*NTA-P<sub>12</sub>C(OG)A (**9**) und MBP-H<sub>6</sub> (**Abb. 20 a**) bzw. *tris*NTA-P<sub>8</sub>C(OG)A (**7**) und dem βC-His<sub>6</sub> Proteasom (**Abb. 20 b**) zeigten beide eindeutig diese Merkmale.



**Abb. 20:** Stabile Komplexbildung zwischen *tris*NTA-PPs und His-getaggtten Proteinen analysiert mittels Gelfiltration. **(a)** Chromatogramm von MBP-H<sub>6</sub> mit *tris*NTA-P<sub>12</sub>C(OG)A (**9**) im molaren Verhältnis 2:1. **(b)** Chromatogramm vom βC-His<sub>6</sub> Proteasom mit *tris*NTA-P<sub>8</sub>C(OG)A (**7**) im molaren Verhältnis 1:7. Die stabile Komplexbildung zwischen dem jeweiligen Protein und dem *tris*NTA-PP ist deutlich zu erkennen (durchgezogene, dunkle Kurven). Die unmarkierten Proteine (gestrichelte, hellgraue Kurven) eluieren zu einem etwas späteren Zeitpunkt und absorbieren nicht bei 495 nm. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz, grau) und 495 nm (rot, orange) detektiert.

Das unmarkierte MBP-H<sub>6</sub> eluierte bei einem Volumen von 16.13 mL. Nach der Inkubation mit einem Unterschuss an **9** (molares Verhältnis 2:1), wodurch eine komplette Bindung des verwendeten **9** erreicht werden sollte, war der Elutionspeak teilweise zu geringerem Volumen verschoben. Da es sich bei MBP-H<sub>6</sub> mit einer *tris*NTA-Gruppe um einen definierten 1:1 Komplex handelte<sup>94</sup>, war nicht die gesamte Menge an angebotenen MBP-H<sub>6</sub> markiert. Der Elutionspeak wies daher zwei gegeneinander verschobene Maxima für die beiden gewählten Wellenlängen auf. Das Maximum der 495 nm Absorption lag bei V = 15.75 mL, während das Maximum der 280 nm Absorption bei einem Volumen von 16.04 mL lag. Freies **9** konnte nicht detektiert werden.

Zusammen mit dem 20S Proteasom wurde **7** in einem 7-fachen molaren Überschuss eingesetzt, weil das Proteasom insgesamt über 14 His-*Tags* verfügte. Aufgrund der 14 His-*Tags* wurden auch hier alle angebotenen *tris*NTA-PPs **7** gebunden. Das freie 20S Proteasom eluierte bei einem Volumen von 1.50 mL, nach der stabilen Markierung mit **7** eluierte der Komplex bei einem Volumen von 1.47 mL. In Gegenwart von Imidazol oder EDTA wurde in keinem der Versuche eine Komplexbildung beobachtet. Somit konnte die spezifische Bindung des über einen *tris*NTA/His-*Tag*-Komplex demonstriert werden.

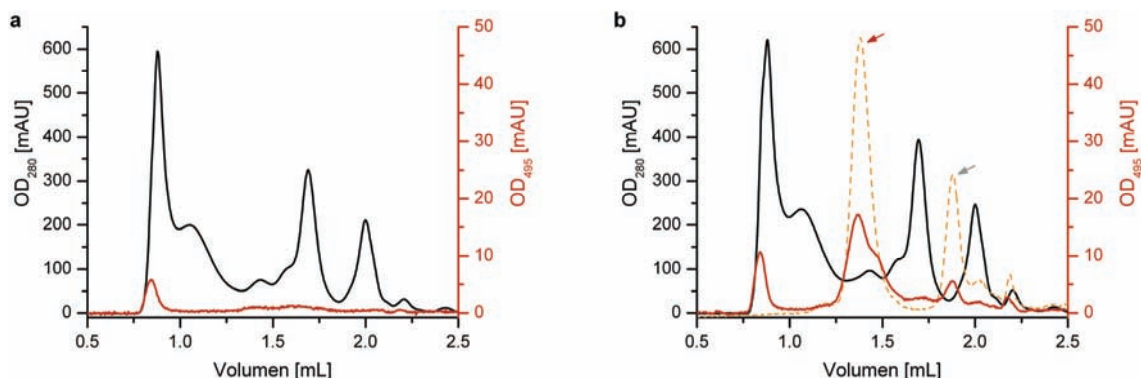
Die exemplarisch durchgeführten Gelfiltrationen demonstrierten, dass die *tris*NTA-PPs **5-10** für die spezifische, reversible Markierung His-*getaggtter* Proteine eingesetzt werden konnten. Ein negativer Einfluss der PPII Helices auf die nanomolaren Bindungseigenschaften der *tris*NTA-Gruppen konnte, im Vergleich zu *tris*NTA-Derivaten ohne Proline, nicht festgestellt werden.

#### V.1.2.4 Selektive Markierung His-*getaggtter* Proteine

Im nächsten Schritt wurde die Übertragbarkeit der bisherigen Ergebnisse auf ein deutlich komplexeres System untersucht. Hierzu wurden Experimente durchgeführt, in denen die spezifische Markierung His-*getaggtter* Proteine in einem kompletten *E. coli* Zellysate mit etwa 4300 verschiedenen Genprodukten<sup>203</sup> untersucht wurde. Auch für diese Studien wurden Gelfiltrationen durchgeführt. Ein Zellysate von *E. coli*, in welchem das  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom überexprimiert worden war, wurde mit dem *tris*NTA-P<sub>8</sub>C(OG)A (**7**) inkubiert.



Die Gelfiltrationsläufe des Zelllysats ohne (**Abb. 21 a**) und mit **7** (**Abb. 21 b**) zeigten deutlich die spezifische Markierung His-*getaggtter* 20S Proteasome im Zelllysats.



**Abb. 21:** Spezifische Markierung His-*getaggtter* Proteine in *E. coli* Zelllysaten analysiert mittels Gelfiltration. **(a)** *E. coli* Zelllysats mit überexprimiertem  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom. **(b)** Dasselbe *E. coli* Zelllysats mit *tris*NTA-P<sub>8</sub>C(OG)A (**7**). Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz) und 495 nm (rot, orange) detektiert. Zum Vergleich ist in **(b)** das Elutionsprofil von isolierten, **7**-markierten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasomen (orange) bei 495 nm dargestellt. Der rote Pfeil markiert den 20S Proteasom/*tris*NTA-PP-Komplex, der graue Pfeil ungebundenes **7**.

Der Vergleich mit isoliertem, markiertem  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom (**Abb. 21 b**; orangene Kurve) demonstrierte, dass **7** nur bei den Retentionsvolumina zu finden war, bei denen es entweder Proteasom-gebunden (roter Pfeil) oder ungebunden (grauer Pfeil) vorlag. Lediglich bei einem Volumen von 0.8 mL, was dem Ausschlussvolumen der Säule entsprach, konnte eine weitere leichte Zunahme der zuvor bereits vorhandenen Absorption bei 495 nm beobachtet werden. Möglich ist, dass bei den Aggregaten His-*getaggte* Proteine vorhanden waren, an die **7** gebunden wurde. Auch denkbar ist eine unspezifische Bindung an die Proteinaggregate, weil bei PPII Helices die Hydrophobizität mit zunehmender Anzahl an Prolinen zunimmt. Dies kann zu einer unspezifischen Wechselwirkung führen. Auch wenn dieser Effekt nicht definitiv beobachtet wurde, so ist er doch bei der Wahl des Prolinlinkers immer zu berücksichtigen.

#### V.1.2.5 Charakterisierung von ABC-Transportern

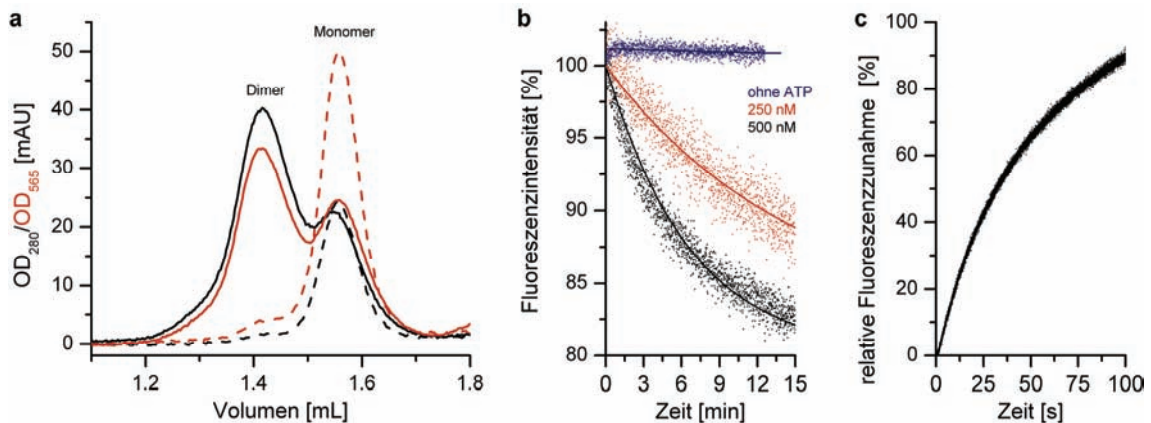
Der große Nutzen der *tris*NTA-PPs für die Charakterisierung von His-*getaggtten* Proteinen soll im Folgenden anhand von zwei ABC-Transportern demonstriert werden.

### V.1.2.5.1 ATP-Hydrolyse von MDL1<sup>204</sup>

Das *tris*NTA-P<sub>4</sub>C(ATTO565)A (**6**) wurde in Zusammenarbeit mit C. VAN DER DOES und C. PRESENTI eingesetzt, um die ATP-Hydrolyse der Nukleotidbindedomäne (NBD) des mitochondrialen ABC-Transporters MDL1 (*multidrug resistance like*) genauer zu untersuchen. Durch die spezifische Markierung der His-getagkten NBDs mit dem *tris*NTA-PP **6** sollte deren ATP-abhängige Assoziation und Dissoziation durch Selbstquenchen verfolgt werden. Neben dem His-getagkten Wildtyp wurde für diese Versuche hauptsächlich eine E599Q-Mutante der NBDs eingesetzt, bei der die ATP-Hydrolyse um einen Faktor 250 reduziert war. Dadurch konnte garantiert werden, dass die Dimerisierung durch die Hydrolyse bestimmt wurde und nicht umgekehrt.

Bei MDL1 hatte sich gezeigt, dass die spezifische Markierung einer *single cysteine*-Mutante mit einem Maleimid-Farbstoff sowohl die ATPase-Aktivität, als auch die Dimerisierung stark negativ beeinflusste. Das *tris*NTA war daher das Mittel der Wahl, um eine spezifische, stabile Markierung der His-getagkten NBDs zu erzielen. **6** wurde gewählt, weil ein Selbstquenchen beobachtet werden sollte. Die im Vergleich zum Prolin-freien Konstrukt erhöhte Fluoreszenzintensität erlaubte die Charakterisierung des Selbstquenchens mit gut detektierbaren Intensitätsänderungen. Auch für den Wiederanstieg der Fluoreszenzintensität aufgrund der Dimerdissoziation wurde ein eindeutig auswertbares Signal erhalten. Der ATTO565-Farbstoff wurde eingesetzt, weil er einen relativ geringen STOKES-Shift aufwies und daher für ein Selbstquenchen gut geeignet war.

Die stabile Markierung der NBDs mit **6** wurde, wie zuvor für andere Proteine gezeigt, mittels Gelfiltration analysiert. Eine Bestimmung der ATP-Hydrolyserate der Wildtyp-NBDs mit und ohne **6** zeigte, dass die Markierung keinen negativen Einfluss auf die ATPase-Aktivität hatte. Die durch eine ATP-Zugabe induzierte Dimerisierung der markierten NBDs wurde ebenfalls mittels Gelfiltration gezeigt (**Abb. 22 a**). Außerdem erfolgte auf diesem Wege die Isolation der für die weiteren Versuche benötigten markierten Monomere und Dimere.

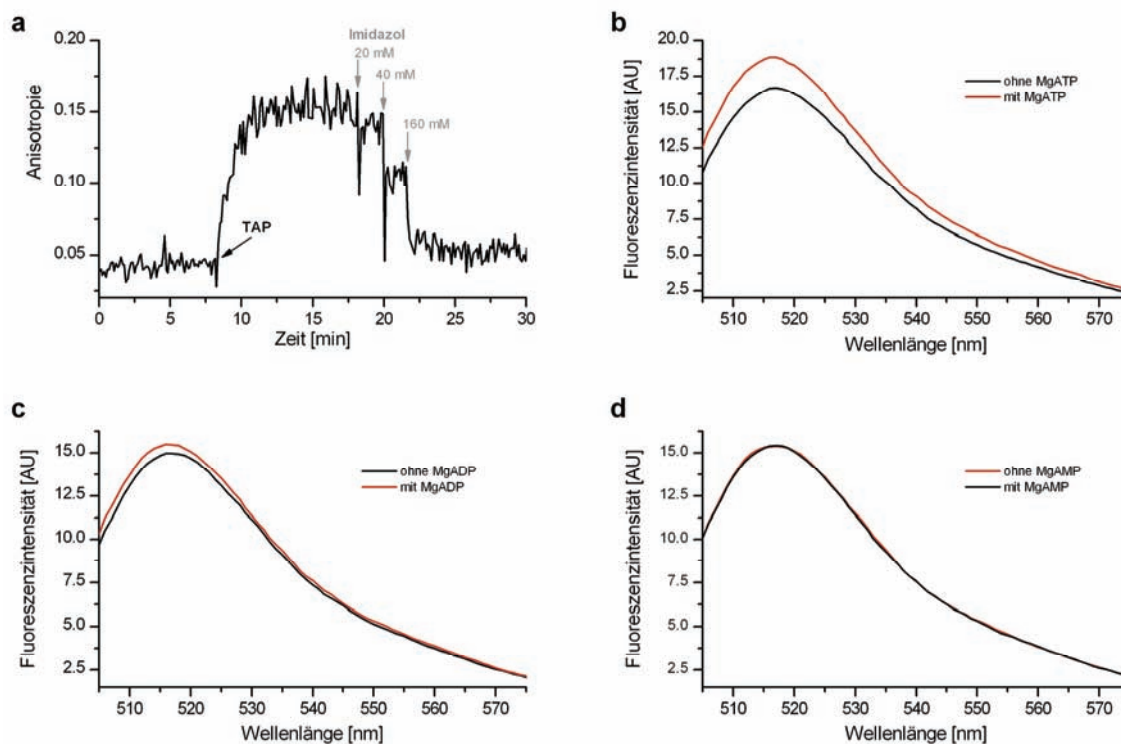


**Abb. 22:** Untersuchung der ATP-Hydrolyse von MDL1 mit *tris*NTA-P<sub>4</sub>C(ATTO565)A (6). (a) Die Dimerisierung von mit **6** ortsspezifisch markierten NBDs wurde durch die Zugabe von ATP induziert (durchgezogene Kurven) und konnte mittels Gelfiltration beobachtet werden. Im Vergleich dazu sind die markierten Monomere ohne ATP (gestrichelte Kurven) gezeigt. (b) Selbstquenchen der ATTO565-Emission aufgrund der durch ATP-Zugabe induzierten Dimerisierung in Abhängigkeit von der NBD-Konzentration. (c) Die Dissoziation von mittels Gelfiltration isolierter NBD-Dimere führt zu einem Anstieg in Fluoreszenzintensität. Alle Experimente wurden bei 20°C durchgeführt. Die Daten für die Abbildungen wurden von C. PRESENTI zur Verfügung gestellt.

Die Kinetik der Dimerisierung markierter Monomere konnte mit dem *tris*NTA-P<sub>4</sub>C(ATTO565)A (**6**) in Echtzeit mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden (**Abb. 22 b**). Eine Zugabe von ATP zu den monomeren NBDs führte zu einem Selbstquenchen der ATTO565-Emission. Die Kinetik der Dissoziation wurde mithilfe der isolierten, markierten Dimere ebenfalls in Echtzeit verfolgt (**Abb. 22 c**). Durch die Trennung der beiden NBDs nach der ATP-Hydrolyse wurde der Effekt des Selbstquenchens wieder aufgehoben. Eine Vielzahl solcher Studien bei verschiedenen Temperaturen, NBD- und ATP-Konzentration sowie Viskositäten erlaubte detaillierte Aussagen über die Assoziations- und Dissoziationskinetiken des ATP-Hydrolysezykluses von MDL1<sup>204</sup>.

### V.1.2.5.2 ATP-Bindung von TAP<sup>205</sup>

M. HERGET und N. KREIBIG setzten das *tris*NTA-P<sub>8</sub>C(OG)A (**7**) für die Charakterisierung der ATP-Bindung von gereinigtem TAP (*transporter associated with antigen processing*) ein. Dazu wurde zunächst die spezifische Markierung des His<sub>10</sub>-Tags von TAP1 mit **7** mittels Anisotropiemessungen untersucht. Die gemessene Anisotropie von **7** stieg durch die Zugabe von His-getaggetem TAP1 von 0.04 auf 0.15 an. Durch die Zugabe von Imidazol wurde der Startwert wieder erreicht, was die spezifische Bindung über die *tris*NTA/His-Tag-Wechselwirkung demonstrierte (**Abb. 23 a**). Die spezifische Markierung wurde auch über die Fluoreszenzlöschung, die bei der Komplexierung des Protein His-Tags eintritt, beobachtet. Auch hier führte die Zugabe von Imidazol zu einem Wiedererlangen der Ausgangsintensität.



**Abb. 23:** Spezifische Markierung von und Konformationsänderungen in TAP1 analysiert durch eine Markierung mit *tris*NTA-P<sub>8</sub>C(OG)A (**7**). **(a)** Spezifische Bindung von **7** an TAP1 gemessen mittels Fluoreszenzanisotropie. Durch die Zugabe von Imidazol wird der Anfangswert wieder erreicht, was die Spezifität der Bindung demonstriert. **(b - c)** Konformative Änderungen des C-Terminus' von TAP1 aufgrund von ATP-Bindung detektiert mit Fluoreszenzspektroskopie. Fluoreszenzspektren von **7**-markiertem TAP1 ohne (schwarze Kurven) oder mit MgATP **(b)**, MgADP **(c)** und MgAMP **(d)** (rote Kurven). Die Daten für die Abbildung wurden von R. ABELE zur Verfügung gestellt.

Nachdem die spezifische Markierung von TAP1 gezeigt werden konnte, wurde **7** benutzt, um konformative Änderungen im TAP-Komplex aufgrund von ATP-Bindung zu untersuchen. In den durchgeführten Studien kam es durch die Bindung von ATP an den mit **7** markierten TAP-Komplex zu einem Fluoreszenzanstieg von etwa 14%. Im Gegensatz dazu wurde mit ADP nur eine sehr schwache (3%), und in Gegenwart von AMP überhaupt keine Intensitätszunahme beobachtet (**Abb. 23 b-d**). Diese Änderung der Fluoreszenzintensität wurde durch die Umstrukturierung des C-Terminus' von TAP1 während der ATP-Bindung an den TAP-Komplex hervorgerufen. Sie konnte erfolgreich genutzt werden, um erstmals die Affinitäten von MgATP und ATP für den TAP-Komplex im Gleichgewicht zu bestimmen.

### V.1.3 Schlussfolgerung

Die fluoreszenten *tris*NTA-PPs **5-10** ermöglichen im Vergleich zu den Derivaten ohne Prolinlinker über deutlich verbesserte Quantenausbeuten. Aus den aufgenommenen Fluoreszenzspektren ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität des Fluorophors mit dem Abstand zur Ni<sup>2+</sup>-beladenen *tris*NTA-Gruppe korreliert. Die nanomolaren Bindungseigenschaften und die hohe Spezifität des *tris*NTAs blieben auch mit den neu eingeführten Prolinsequenzen vollkommen erhalten. In Experimenten mit Membranproteinen konnte der große Nutzen der Verbindungen zur Proteincharakterisierung demonstriert werden.

### V.1.4 Ausblick

Die fluoreszenzmarkierten *tris*NTA-PPs sollten, aufgrund ihrer erhöhten Quantenausbeute, für Einzelmolekül-Studien geeignet sein. Soll bei solchen Messungen Fluoreszenz zum Auslesen des Signals eingesetzt werden, dann ist eine hohe Quantenausbeute und Lebensdauer des Fluorophors unabdingbar. Außerdem sollte der Reporter im Vergleich zu dem zu untersuchenden Protein relativ klein sein, damit eine räumliche Zuordnung stattfinden kann. Die Größe der AFPs ist ein Grund, der ihren Einsatz in Einzelmolekül-Studien stark beschränkt. Es ist auch wichtig, dass der fluoreszente Reporter stabil an das zu untersuchende Protein gebunden ist, um ein Abfallen zu verhindern und so möglichst lange Studien durchführen zu können.

Die hier vorgestellten *tris*NTA-PPs können alle diese Voraussetzungen erfüllen. Die Modifikation mit einem beliebigen Fluorophor mit verbesserter Quantenausbeute und Lebensdauer ist ohne Probleme möglich, so dass die *tris*NTA-PPs der jeweiligen Fragestellung ideal angepasst werden können.

## V.2 Aktivitätskontrolle des 20S Proteasoms

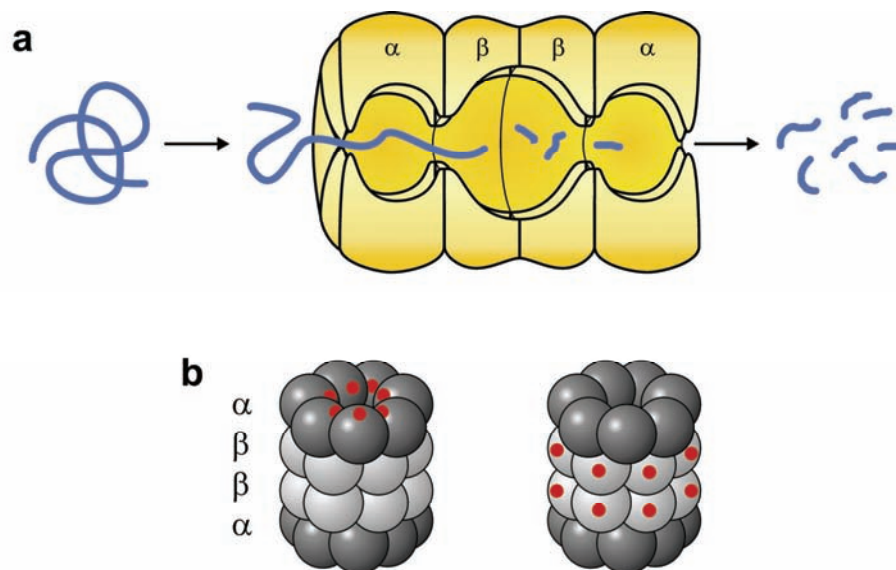
### V.2.1 Hintergrund

In diesem Projekt sollte anhand des 20S Proteasoms demonstriert werden, dass die MCHs für die gezielte Manipulation aktiver, makromolekularer Proteinkomplexe eingesetzt werden können. Das 20S Proteasom ist ein proteolytisch aktiver Kernkomplex, der mit den 19S oder 11S Regulationspartikeln (RPs) den 26S Proteasomkomplex bildet. Dieser stellt die zentrale Degradationsmaschinerie in eukaryotischen Zellen dar. Im Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselprozess übernimmt der Proteasomkomplex den Abbau von unerwünschten und funktionsgestörten Proteinen<sup>206-209</sup>. Darüber hinaus reguliert er verschiedene Schlüsselprozesse in Zellen, z.B. Transkription, Signaltransduktion und Apoptose, und spielt somit eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung.

Die fassförmige Struktur des 20S Proteasoms (700 kDa) wird aus vier gestapelten Ringen von jeweils sieben Untereinheiten ( $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ ) gebildet, die drei Nanokompartimente einschließen. Die zentrale Degradationskammer setzt sich aus den beiden inneren Ringen zusammen, die aus jeweils sieben  $\beta$ -Untereinheiten bestehen. Die beiden äußeren Ringe sind aus sieben dicht gepackten  $\alpha$ -Untereinheiten aufgebaut und schließen zwei Vorkammern ein<sup>210,211</sup>. Der Substrateintritt in diesen multikatalytischen Enzymkomplex wird wahrscheinlich durch die *N*-terminalen Enden der  $\alpha$ -Untereinheiten bestimmt. Im latenten Zustand sind diese Regionen durch eine Vielzahl vernetzter Wechselwirkungen miteinander verbunden, so dass der Eintritt von Substraten an beiden Seiten des Proteasoms erschwert wird. Dabei sind die *N*-terminalen Enden nur ein Hindernis für Proteinsubstrate, wohingegen der Eintritt und Abbau von kurzen Polypeptiden durch die Verengung nicht behindert wird<sup>212</sup>. Durch Anlagerung von RPs wie PA700, PA28 oder PAN wird der Proteasomkomplex durch Öffnen der Eingänge in einen aktiven Zustand überführt, in welchem nun der prozessive Abbau von Proteinen uneingeschränkt möglich ist<sup>213-216</sup>.

Bei den  $\alpha$ -Untereinheiten aus Archaea sind die *N*-terminalen Enden unstrukturiert und erlauben den Substrateintritt durch zwei Eingänge von ca.  $\sim 13$  Å Durchmesser auch ohne spezielle Regulatoren<sup>217,218</sup>. Durch den Bruch der  $D_7$ -Symmetrie des 20S Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* mittels ortsspezifischer, einheitlich orientierter Immobilisierung an NTA-Grenzflächen wurde die Bedeutung dieser beiden

Öffnungen sowohl für den Substrateintritt als auch für den Produktaustritt demonstriert<sup>219</sup>.



**Schema 22:** Schematische Darstellung des 20S Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum*. **(a)** Der Substratabbau der Proteine zu Peptiden erfolgt im Inneren des Proteasomkomplexes. Substrateintritt und Produktaustritt erfolgen durch beide Öffnungen. Der Eintritt in den Komplex wird durch die N-terminalen Regionen der  $\alpha$ -Untereinheiten reguliert. **(b)** Die His-Tags (rot) wurden entweder an den N-terminalen Enden der  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom; links) oder die C-terminalen Enden der  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom; rechts) eingeführt.

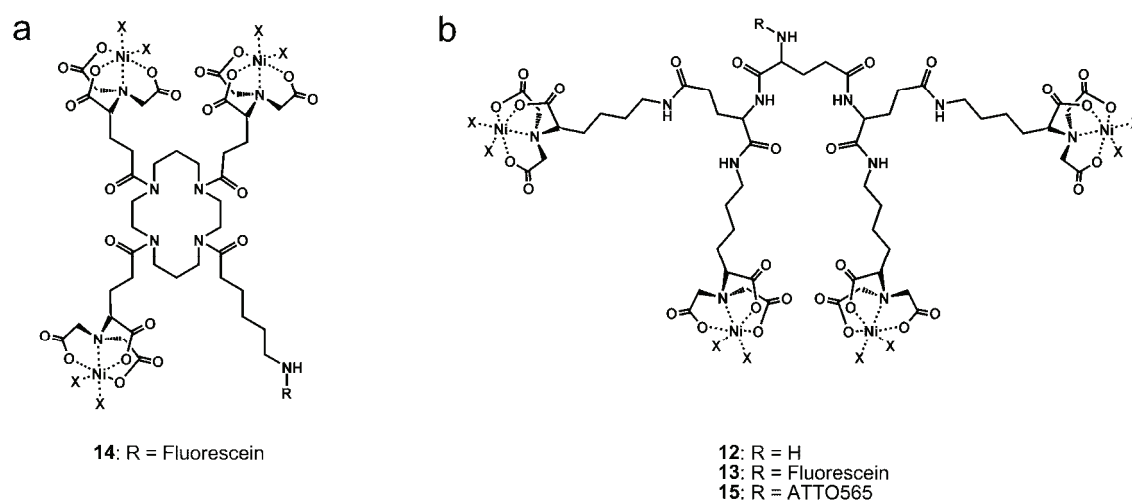
In diesem Projekt sollte erstmals das *tetrakisNTA* (**12**) für die Manipulation des 20S Proteasomkomplexes von *Thermoplasma acidophilum* eingesetzt werden. Die vier NTA-Gruppen sollten genutzt werden, um die His-Tags, welche sich an den  $\alpha$ -Untereinheiten rund um die Öffnungen des Proteasoms befinden (**Schema 22 b**), zu vernetzen und so den Eintritt proteinogener Substrate zu blockieren. Befinden sich die His-Tags dagegen an den  $\beta$ -Untereinheiten, so sollte die Bindung von **12** keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteasoms haben.



## V.2.2 Ergebnisse und Diskussion

### V.2.2.1 Spezifische Bindung der MCHs

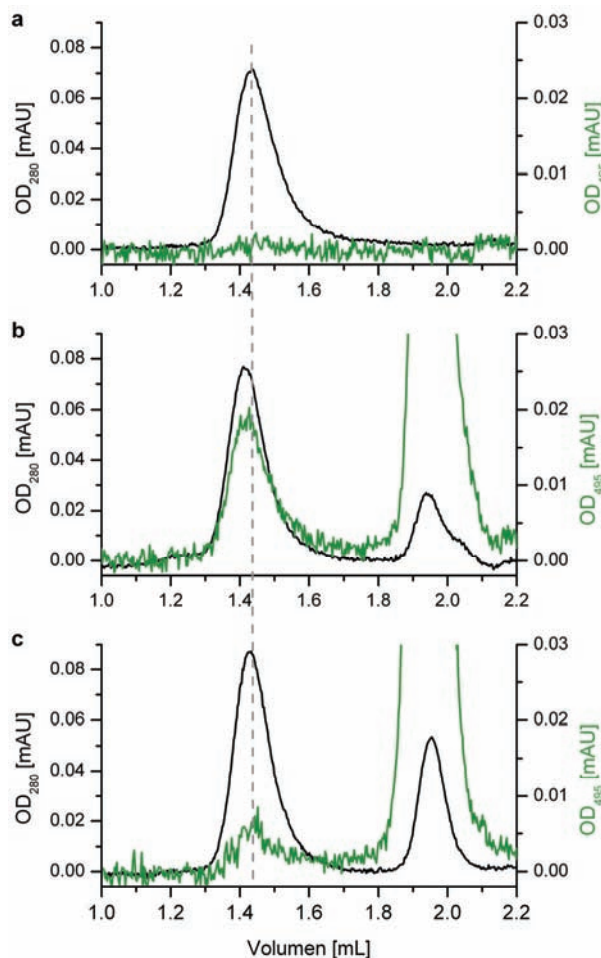
Zunächst sollte die Stabilität und Spezifität der zwischen den His-getaggen Proteasomkomplexen und den MCHs gebildeten Komplexe mittels Gelfiltration untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden fluoreszenzmarkierte *tris*- und *tetrakis*NTAs eingesetzt, deren Absorption deutlich von 280 nm abwich. Sowohl das  $\alpha$ N- als auch das  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom wurden 3 h mit einem 10-fachen Überschuss von einem der Ni<sup>2+</sup>-beladenen Chelatorköpfe inkubiert und dann auf eine Superose™ 6 PC 3.2/30 Säule aufgetragen. Der hohe Überschuss an MCH wurde gewählt, um im Gleichgewicht die maximal mögliche Anzahl an gebundenem *tris*NTA(Fluoreszein) (**14**) oder *tetrakis*NTA(Fluoreszein) (**13**; **Abb. 24**) zu erzielen.



**Abb. 24:** Multivalente Chelatorköpfe. **(a)** Ni<sup>2+</sup>-beladenes *tris*NTA(Fluoreszein) (**14**). **(b)** Ni<sup>2+</sup>-beladenes *tetrakis*NTA (**12**) und *tetrakis*NTA(Fluoreszein) (**14**). X = Wasser oder Histidin.

**Abb. 25** zeigt die Ergebnisse exemplarisch für das  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom mit *tetrakis*NTA(Fluoreszein) (**13**). Für die anderen denkbaren Kombinationen wurden analoge Ergebnisse erhalten. Unmarkierte Proteasomkomplexe eluierten bei einem Volumen von 1.44 mL und zeigten keine Absorption bei 495 nm (**Abb. 25 a**). Mit NTA-Köpfen markierte Proteasome eluierten bei niedrigerem Volumen (V = 1.41 mL) und die Elutionspeaks zeigten neben der Proteinabsorption bei 280 nm eine zusätzliche Absorption bei 495 nm (**Abb. 25 b**). Freies, nicht gebundenes **13** eluierte bei 1.94 mL. Erfolgte die Inkubation in Gegenwart von 10 mM EDTA oder 100 mM Imidazol, so

konnte keine Fluoreszenzmarkierung beobachtet werden. Durch eine halbstündige Inkubation mit 50 mM Imidazol wurde eine 70-80%-ige Dissoziation des zuvor gebildeten Komplexes erreicht (**Abb. 25 c**). Die Gelfiltrationsläufe zeigten eindeutig die Bildung stabiler, reversibler Komplexe zwischen dem His-getaggen 20S Proteasom und den MCHs. Die ortsspezifische Bindung an die His-Tags wurde zum einen durch die Inkubation in Gegenwart von EDTA oder Imidazol gezeigt, zum anderen durch die Reversibilität der Bindung durch die Zugabe von Imidazol.



**Abb. 25:** Stabile Komplexbildung von *tetrakis*NTA(Fluoreszein) (**13**) mit dem 20S Proteasom von *T. acidophilum* analysiert mittels Gelfiltration.  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom ohne (**a**) und mit (**b**) einem 10-fachen Überschuss von **13**. (**c**) Isolierung von freigesetztem 20S Proteasom durch Zugabe von 50 mM Imidazol zum Laufpuffer. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz) und 495 nm (grün) detektiert.

#### V.2.2.2 Anzahl der gebundenen MCHs pro 20S Proteasomkomplex

Um die Anzahl der pro  $\alpha$ N- oder  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom gebundenen *tris*NTA(Fluoreszein)s (**14**) und *tetrakis*NTA(Fluoreszein)s (**13**) zu bestimmen, wurden die entsprechenden Komplexe mittels Gelfiltration isoliert. Anschließend wurde die Konzentration des jeweiligen Chelatorkopfes über die charakteristische Absorption des verwendeten Fluorophors und die des Proteasoms mittels BCA-Test<sup>189</sup> bestimmt.

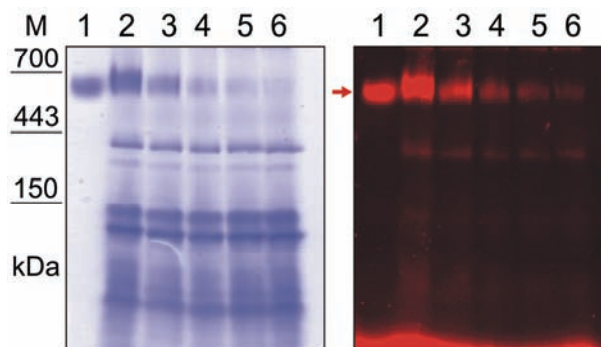
**Tabelle 19:** Anzahl der pro Proteasomkomplex gebundenen multivalenten Chelatorköpfe.

	<i>tris</i> NTA ( <b>14</b> )	<i>tetrakis</i> NTA ( <b>13</b> )
$\alpha$ N-His <sub>6</sub> Proteasom	4.06 ± 1.12	2.03 ± 0.76
$\beta$ C-His <sub>6</sub> Proteasom	5.03 ± 0.84	3.04 ± 0.18

Wie zu erwarten, wurden deutlich weniger Chelatorköpfe gebunden, als *His-Tags* zur Verfügung standen (**Tabelle 19**). Diese Beobachtung zeigte, dass es sich um eine dynamische Komplexbildung handelte und eine MCH mehrere *His-Tags* komplexieren konnte. Die höheren Markierungsverhältnisse für das  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom ließen sich durch die weniger dicht gepackten *His-Tags* an der Seite des Proteasoms erklären. Aufgrund der höheren Anzahl an NTA-Gruppen wurden für das *tetrakis*NTA(Fluoreszein) (**13**) niedrigere Werte als für das *tris*NTA(Fluoreszein) (**14**) erhalten. Aus der Bestimmung war außerdem zu erkennen, dass beim  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom pro Eingang zwei *tris*NTAs bzw. ein *tetrakis*NTA angelagert waren.

### V.2.2.3 Spezifische Markierung in Zelllysaten

Neben der Gelfiltration bietet die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) eine weitere Möglichkeit, die Bindung der MCHs an die *His-getaggt* Proteasomkomplexe unter nativen Bedingungen zu untersuchen. Um die Spezifität der Markierung zu zeigen, wurden *E. coli* Zelllysate, die etwa 4300 verschiedenen Genprodukten<sup>203</sup> aber kein *His-getaggt* Protein enthielten, mit verschiedenen Mengen des isolierten  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasoms versetzt. Diese und isolierte  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasome wurden anschließend mit *tetrakis*NTA(ATTO565) (**15**) inkubiert und die gebildeten Komplexe mithilfe nativer PAGE analysiert. Die Auswertung der Gele erfolgte durch Coomassie-Färbung und Fluoreszenzanalyse an einem Lumi Imager bei 600 nm (**Abb. 26**). Die Bilder zeigen deutlich, dass die Markierung des  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasoms in kompletten Zelllysaten spezifisch war. Selbst sehr geringe Mengen wie 0.5  $\mu$ g Proteasom konnten in 140  $\mu$ g *E. coli* Proteinen spezifisch markiert und detektiert werden.



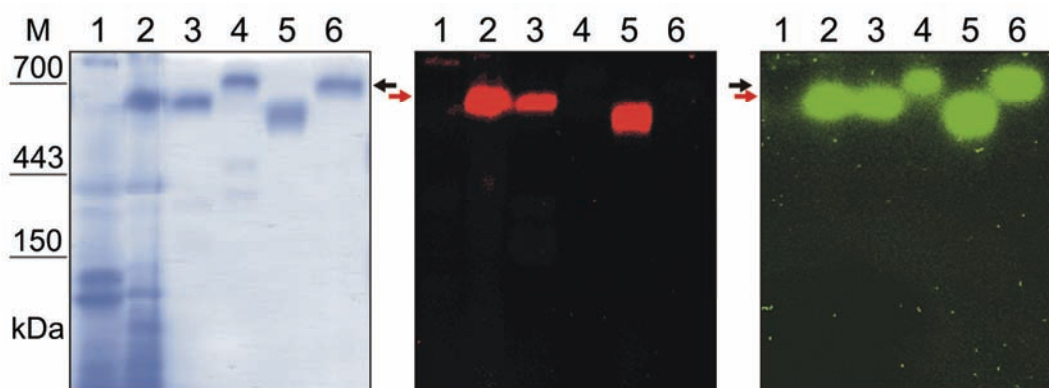
**Abb. 26:** Spezifische Markierung des  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasoms in kompletten *E. coli* Zelllysaten. Das isolierte  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom (4  $\mu$ g; Spur 1) und *E. coli* Zelllysate (140  $\mu$ g *E. coli* Proteine) mit zugesetzten Mengen des  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasoms (8  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 3  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 0.5  $\mu$ g in Spur 2, 3, 4, 5, 6) wurden mit *tetrakis*NTA(ATTO565) (**15**) (17.1 pmol) inkubiert. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt (links). **15** wurde bei  $\lambda_{em} = 600$  nm detektiert (rechts). M: Molekülmassenstandards.

In einem weiteren Experiment wurden *E. coli* Zelllysate, die überexprimiertes  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom enthielten, mit gereinigtem markierten und unmarkierten  $\alpha$ N- und  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasomkomplexen mittels nativer PAGE verglichen. Im Vergleich zu den unmarkierten liefen die markierten Proteasomkomplexe aufgrund der zusätzlichen negativen Ladungen im Gel etwas weiter. Der Vergleich des mit **15** markierten Zelllysats mit isoliertem  $\alpha$ N- oder  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasomen zeigte, dass die fluoreszierende Bande bei etwa 700 kDa (roter Pfeil) von den fluoreszenzmarkierten Proteasomen stammte. In Zelllysaten, die keine rekombinanten 20S Proteasome enthielten, konnte keine Markierung beobachtet werden (**Abb. 27**; Spur 1). Dies bewies ebenfalls die hohe Selektivität und Spezifität der Markierung in Zelllysaten.

#### V.2.2.4 Peptidase-Aktivität der markierten 20S Proteasomkomplexe

Die Peptidase-Aktivität der unmarkierten und mit *tetrakis*NTA(ATTO565) (**15**) markierten Proteasomkomplexe wurde mithilfe eines In-Gel-Substrat-Überschichtungsexperiments untersucht. Dazu wurde ein natives Polyacrylamidgel, das isolierte Proteasomkomplexe und Zelllysate mit und ohne überexprimiertes  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom enthielt, mit Suc-LLVT-AMC überschichtet. Beim Suc-LLVT-AMC handelte es sich um ein kleines, nichtfluoreszierendes Peptidsubstrat, welches durch eine proteolytische Spaltung Amino-4-methylcoumarin (AMC) freisetzte<sup>190,220</sup>.

Fluoreszenzaufnahmen des überschichteten Gels zeigten, dass sowohl die freien als auch die markierten Proteasomkomplexe aktiv waren (**Abb. 27**).



**Abb. 27:** Spezifische Markierung des 20S Proteasoms innerhalb eines kompletten Zelllysats analysiert mittels nativer PAGE und Fluoreszenzanalyse. Zelllysate (140  $\mu$ g *E. coli* Proteine) oder isolierte 20S Proteasomkomplexe (4  $\mu$ g) wurden mit *tetrakis*NTA(ATTO565) (**15**) (17.1 pmol in Spur 1, 2, 3, 5) inkubiert. Zelllysate ohne (Spur 1) und mit Überexpression (Spur 2) des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms. Markierte und unmarkierte  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasome (Spur 3 und 4) und  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasome (Spur 5 und 6). Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau G250 angefärbt (links). **15** wurde bei  $\lambda_{em} = 600$  nm detektiert (Mitte). Die Aktivitäten der 20S Proteasome wurde bei  $\lambda_{em} = 520$  nm durch ein Überschichtungsexperiment mit 100  $\mu$ M Suc-LLVT-AMC nachgewiesen (rechts). Schwarzer und roter Pfeil: unmarkiertes bzw. markiertes Proteasom. M: Molekülmassenstandards.

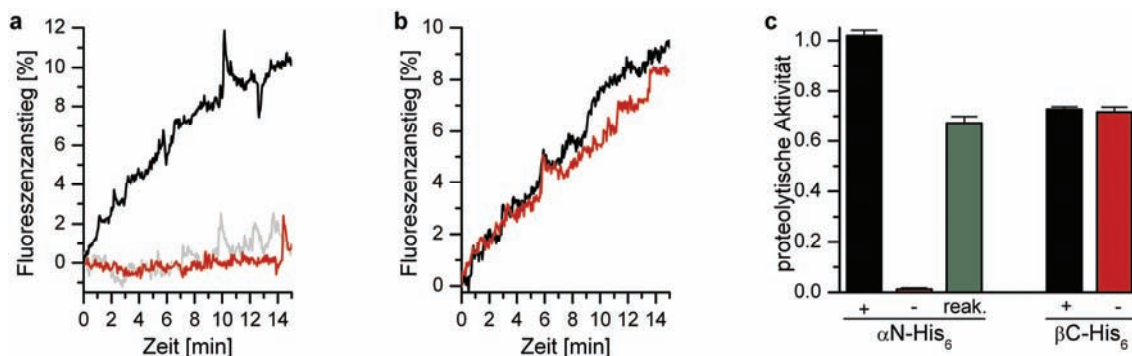
Das Überschichtungsexperiment demonstrierte, dass die Aktivitäten der einzelnen Peptidase-Schnittstellen durch die Bindung von **15** nicht merklich verändert wurden. Zur Untersuchung der prozessiven proteolytischen Aktivität der Proteasomkomplexe mussten jedoch proteinartige Substrate eingesetzt werden.

### V.2.2.5 Reversible Blockierung des $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms

Fluoreszein-markiertes Casein wurde als proteinartiges Substrat eingesetzt, um den Einfluss des *tetrakis*NTAs (**12**) auf die Aktivitäten der  $\alpha$ N- und  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasomkomplexe zu untersuchen. Aufgrund einer Übermarkierung führte die Spaltung des Caseins zu einem Anstieg des zuvor gelöschten Fluoreszenzsignals<sup>190</sup> und ermöglichte so einen direkten Vergleich der Aktivitäten (**Abb. 28**).

Die beiden unmarkierten, rekombinanten 20S Proteasome wiesen vergleichbare Aktivitäten auf (**Abb. 28**; schwarze Kurven und Balken). Die Aktivität des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms wurde durch die Inkubation mit *tetrakis*NTA vollkommen blockiert,

wohingegen dies bei dem  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom selbst durch einen 1000-fachen molaren Überschuss von **12** nicht gelang (Abb. 28; rote Kurven und Balken).



**Abb. 28:** Echtzeitabbau von Fluoreszein-markiertem Casein (100 nM) durch das 20S Proteasom (10 nM) bei 60°C. **(a)** Aktivität des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms vor (schwarze Kurve) und nach Inkubation mit 140 nM *tetrakis*NTA (**12**) (rote Kurve) verglichen mit dem äquilibrierten Fluoreszein-markiertem Casein (graue Kurve). **(b)** Aktivität des  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasoms vor (schwarze Kurve) und nach Inkubation mit 10  $\mu$ M **12** (rote Kurve). **(c)** Proteolytische Aktivitäten der rekombinanten 20S Proteasome mit (rote Balken) und ohne (schwarze Balken) **12** sowie die Aktivität von reaktiviertem (reak.)  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom nach Behandlung mit 50 mM Imidazol (grüner Balken).

Diese Befunde belegten, dass die Bindung des multivalenten *tetrakis*NTAs (**12**) an die His-Tags der  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms zu einer spezifischen, vollständigen Unterbindung des Eintritts von Proteinen in die Degradationsmaschinerie führte. Offensichtlich führte die Komplexierung zu einer Umstrukturierung der His-Tags in der Nähe der Eingänge des Proteasomkomplexes, wodurch der prozessive Proteinabbau verhindert wurde. Bei Abwesenheit von Ni<sup>2+</sup>-Ionen und/oder in Gegenwart von EDTA wurde die proteolytische Aktivität des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms durch das *tetrakis*NTA (**12**) nicht beeinflusst. Dies demonstrierte sowohl die spezifische Bindung als auch die Kontrolle über die enzymatische Aktivität des Proteasomkomplexes. Zugewetztes Imidazol konkurrierte mit den His-Tags um die Bindung und konnte somit zur Reaktivierung des blockierten Proteasoms genutzt werden. Das Entfernen von **12** und die Isolierung des freien  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms wurde mittels Gelfiltration erreicht (Abb. 28 c; reak.). Das isolierte, reaktivierte  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom zeigte 70-80% seiner ursprünglichen proteolytischen Aktivität. Dies stimmte gut mit der Menge an unkomplexiertem Proteasom überein, das nach der Gelfiltration erhalten werden konnte (Abb. 25 c). Die Inaktivierung des 20S Proteasoms durch **12** war folglich reversibel und

die inhärente, proteolytische Aktivität wurde durch die Komplexierung und Dekomplexierung nicht beeinflusst.

### V.2.3 Schlussfolgerung

Die Verwendung von fluoreszenten *tris*- und *tetrakis*NTAs bietet dank deren hoch spezifischer Bindungseigenschaften im nanomolaren Bereich eine elegante Methode zur Markierung von Proteinen. Wie mittels Gelfiltration gezeigt wurde, kann die Wechselwirkung durch Imidazol gezielt beeinflusst werden. Durch native PAGE konnte die hohe Spezifität selbst in kompletten *E. coli* Zelllysaten demonstriert werden. Die stabile und spezifische Markierung auch bei geringen Proteinmengen erlaubt die Visualisierung und einfache Quantifizierung von *His-getaggten* Proteinen durch native PAGE und Fluoreszenzanalyse.

Die reversible Blockierung des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms durch das *tetrakis*NTA (**12**) ist ein Beleg, dass die MCHs auch für die spezifische Kontrolle und gezielte Manipulation von makromolekularen Proteinkomplexen genutzt werden können. Durch **12** wurde eine Umstrukturierung der endständigen *His-Tags* des Proteasoms erreicht, die den Eintritt von Proteinen blockierte. Dabei blieb die Aktivität der Peptidase-Schnittstellen vollkommen unbeeinflusst.

### V.2.4 Ausblick

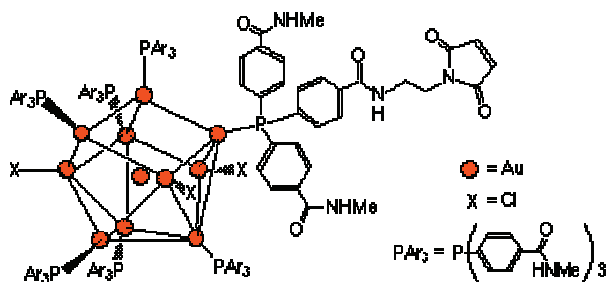
Die hohe Spezifität und Bindungsaffinität sollte im Prinzip die *in vivo* Markierung und Inaktivierung des 20S Proteasoms ermöglichen; dies dürfte angesichts dessen zentraler Rolle in zahllosen zellulären Prozessen großes Interesse wecken. Dabei ist der wichtigste Punkt das Einbringen von **12** in die Zelle. Dies könnte z.B. mithilfe von Mikroinjektionen oder zellpenetrierenden Oligoargininpeptiden, mit denen **12** modifiziert werden müsste, erfolgen.

## V.3 Nanogold® modifiziertes *tris*NTA

### V.3.1 Hintergrund

In diesem Projekt sollte das *tris*NTA mit einem Goldcluster so modifiziert werden, dass es in der EM eingesetzt werden konnte. Die *tris*NTA-Goldcluster sollten eine genaue Lokalisierung von His-*Tags* in Proteinen, z.B. für die Identifizierung von Proteinuntereinheiten, erlauben<sup>221</sup>. Um den Einsatz in Einzelmolekül-Analysen zu ermöglichen, sollte der Goldcluster im Verhältnis zum His-*getaggt* Protein eine möglichst geringe Größe aufweisen. Bei zu großen Goldclustern kann es ansonsten Probleme beim Zuordnen und Auswerten einzelner Partikel geben. Andererseits sollte der Goldcluster eine Größe besitzen, welche die direkte Visualisierung in der Elektronenmikroskopie erlaubt.

Als hinsichtlich der Größe geeignet stellte sich das sogenannte Nanogold® der Firma Nanoprobes heraus. Beim Nanogold® handelt es sich um einen Goldcluster, der im Mittel aus 67 Goldatomen besteht, einen Durchmesser von 1.4 nm und ein Molekulargewicht von etwa 15 kDa besitzt<sup>222</sup>. Die Oberflächenatome sind entweder mit einem Triarylphosphinliganden oder Halogenid abgesättigt, wodurch ein stabiles Molekül mit definierter Struktur und ohne Ladung gebildet wird (**Abb. 29** zeigt ein Monomaleimido-Undecagold).



**Abb. 29:** Struktur von Monomaleimido-Undecagold®. Das benutzte Nanogold® besitzt eine größere Anzahl an Goldatomen, die Oberflächenatome sind mit denselben Liganden koordiniert<sup>223</sup>.

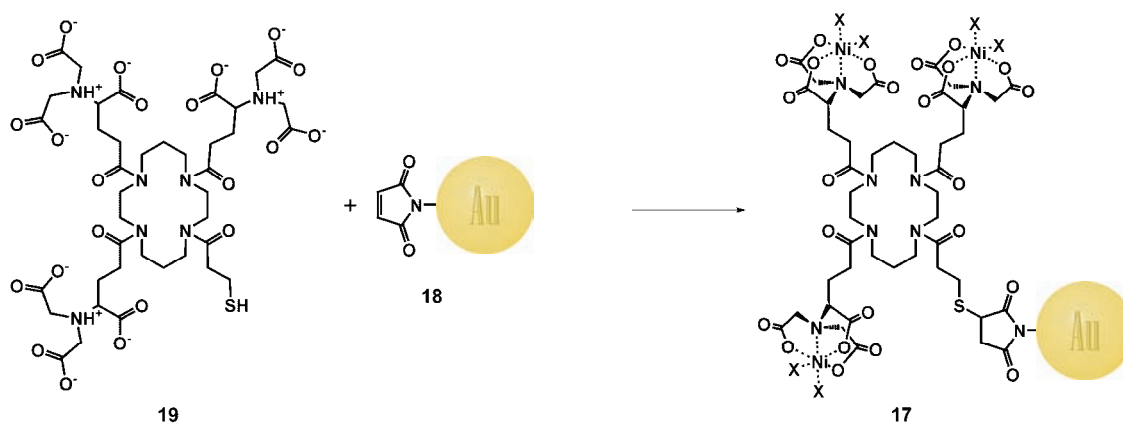
Das Nanogold® wird kommerziell mit einer Vielzahl unterschiedlicher Modifikationen angeboten, die für verschiedenste Fragestellungen eingesetzt werden können<sup>224,225</sup>. Die meisten Nanogold®-Derivate können kovalent an Antikörper, Proteine oder auch kleine Moleküle wie Peptide oder ATP gekuppelt werden, wodurch eine stabile Modifikation erreicht wird. Wichtig ist hierbei die Unterscheidung zu dem ebenfalls häufig eingesetzten kolloidalem Gold, welches nur an Oberflächen adsorbiert und im Laufe der Zeit dissoziieren kann. Ebenfalls kommerziell erhältlich ist Ni-NTA-



Nanogold® (**16**), welches eine hohe Anzahl von Ni<sup>2+</sup>-beladenen *mono*NTA-Gruppen auf der Oberfläche exponiert und für die Markierung von His-*getaggt*en Proteinen gedacht ist. Die hohe Anzahl an NTA-Gruppen ist bei diesem Nanogold®-Derivat nötig, um die stabile Bindung an einen His-*Tag* zu ermöglichen. Der Goldcluster **16** wurde 1999 erstmals von J.F. HAINFELD et al. beschrieben, wobei die Markierung His-*getaggt*er Proteine mittels Gelfiltration, Blot-Techniken, UV/Vis-Spektroskopie und Elektronenmikroskopie untersucht wurde<sup>226</sup>. In weiteren Studien wurde es unter anderem für Einzelmolekül-Analysen eingesetzt, um die Lage bestimmter His-*getaggt*er Untereinheiten in Proteinkomplexen zu identifizieren<sup>227-229</sup>.

Aufgrund der hohen Anzahl von NTA-Gruppen, kann es bei dem Einsatz von **16** leicht zu Quervernetzungen von His-*getaggt*en Proteinen kommen kann. Die Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit bestand darin, ein *tris*NTA-Nanogold® (*tris*NTA(NG); **17**) mit einer einzigen *tris*NTA-Gruppe auf der Oberfläche herzustellen. Die nanomolaren Bindungseigenschaften des *tris*NTAs sollten eine stabile, spezifische, reversible Komplexierung an einen bestimmten His-*Tag* ermöglichen, wobei durch die Monofunktionalität auf der Oberfläche eine Quervernetzung ausgeschlossen wäre.

Für die Darstellung des *tris*NTA(NG)s (**17**) wurde folgender Synthesepfad entwickelt. Ein Thio-*tris*NTA (**19**) sollte verwendet werden, um es mittels MICHAELS-Addition mit einem Monomaleimido-Nanogold® (**18**) umzusetzen. Die Kupplung eines Thiols an ein Maleimid verläuft in der Regel sehr gut und mit hohen Ausbeuten (**Abb. 30**). Ebenfalls denkbar wäre ein Mono-*Sulfo*-NHS-Nanogold® für die Umsetzung mit einem aminofunktionalisierten *tris*NTA gewesen. Aufgrund der guten Erfahrungen mit der Maleimid/Thiol-Chemie, wurde aber auf das Maleimido-Derivat zurückgegriffen.



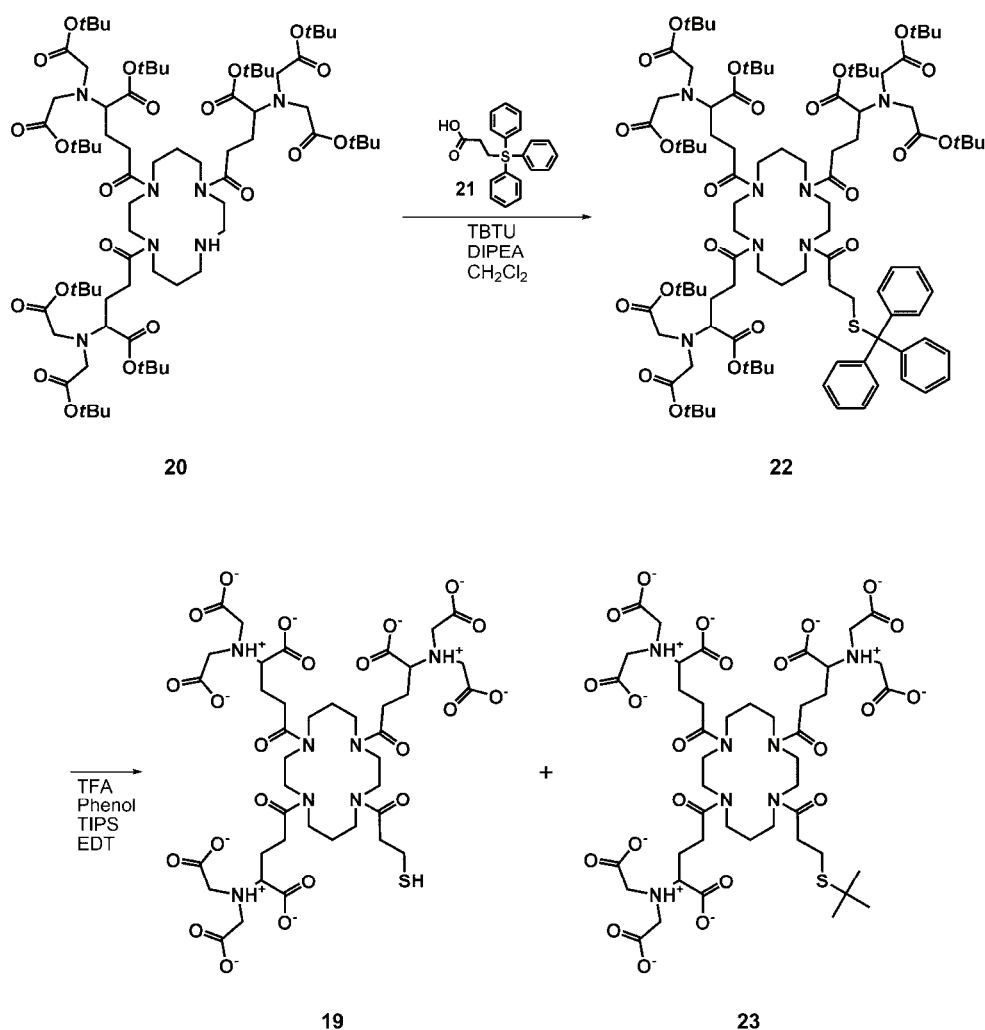
**Abb. 30:** Geplante Umsetzung von Monomaleimido-Nanogold® (**18**) mit Thio-*tris*NTA (**19**). Nach erfolgter Reinigung erhält man durch Ni<sup>2+</sup>-Beladung das gewünschte *tris*NTA-Nanogold® (**17**). X = Wasser oder Histidin.

Die erste Aufgabe zur Darstellung von monofunktionalisiertem *tris*NTA(NG) (**17**) bestand damit darin, ein *tris*NTA mit freier Thiolgruppe zu synthetisieren. Nach erfolgreicher Synthese von **17** sollte die Bindung an das His-*getaggte* 20S Proteasom hinsichtlich Stabilität und Spezifität charakterisiert werden. Abschließend war eine elektronenmikroskopische Untersuchung des mit *tris*NTA(NG) (**17**) markierten 20S Proteasoms geplant.

### V.3.2 Ergebnisse und Diskussion

#### V.3.2.1 Synthese von Thio-*tris*NTA mit 3-Tritylsulfanylpropionsäure

Zunächst wurde versucht, die Thiolgruppe durch eine 3-Thiopropionsäure mit säurelabiler Trt-Schutzgruppe in ein *t*Bu-geschütztes *tris*NTA einzuführen. Dafür erfolgte die erfolgreiche Umsetzung von *tris*NTA(*O*tBu) (**20**) mit 3-Tritylsulfanylpropionsäure (**21**) in Anwesenheit von TBTU und DIPEA (**Abb. 31**).

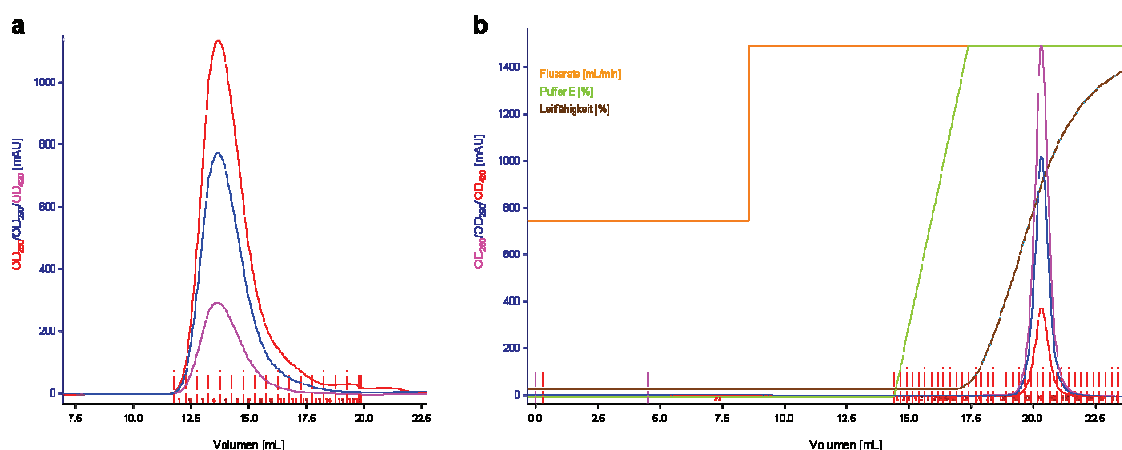


**Abb. 31:** Syntheseroute für die Darstellung von Thio-*tris*NTA (**19**) mit 3-Tritylsulfanylpropionsäure (**21**).

Obwohl die anschließende Entschützung des Trityl- und *t*Bu-geschützten *tris*NTAs **22** in Gegenwart von EDT durchgeführt wurde, wurde neben dem gewünschten Produkt **19** ein Nebenprodukt **23** mit *t*Bu-geschütztem Thiol identifiziert. Das Nebenprodukt ließ sich massenspektroskopisch nachweisen und war auch nach wiederholtem oder deutlich verlängertem Entschützen detektierbar. Da eine Reinigung auf dieser Stufe nicht gelang, wurde für die ersten Kupplungsversuche mit dem Monomaleimido-Nanogold® (**18**) die Produktmischung aus **19** und **23** eingesetzt. Dabei konnte das Thio(*t*Bu)-*tris*NTA **23** nicht mit der Maleimidofunktion reagieren und sollte zu einem späteren Zeitpunkt abgetrennt werden. Eine Bestimmung der Verhältnisse von **19** zu **23** mittels NMR-Spektroskopie konnte nicht durchgeführt werden, weil eine eindeutige Zuordnung der Peaks aufgrund der Komplexität der Spektren nicht möglich war.

### V.3.2.2 Modifikation des Monomaleimido-Nanogoldes®

Im ersten Versuch wurde das Monomaleimido-Nanogold® (**18**) mit 20 äq. der Produktmischung aus Thio-*tris*NTA (**19**) und Thio(*t*Bu)-*tris*NTA (**23**) umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 h bei 4°C erfolgte die Abtrennung von nicht umgesetztem **19** und **23** mittels Gelfiltration mit einer Superdex™ 200 PC 3.2/30 Säule (**Abb. 32 a**).



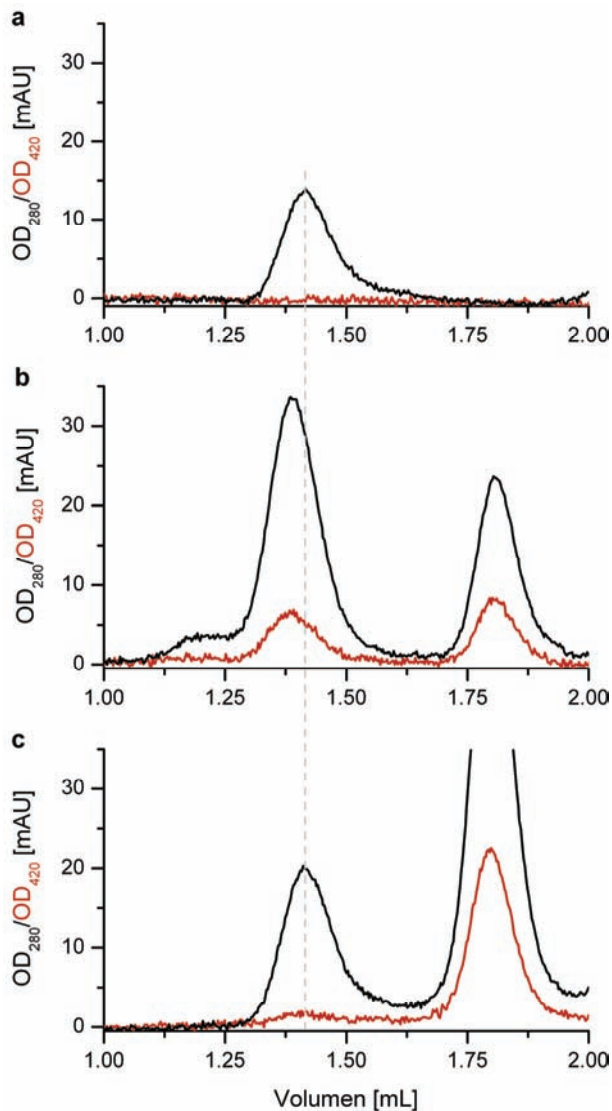
**Abb. 32:** Reinigung des mit Thio-*tris*NTA (**19**) umgesetzten Monomaleimido-Nanogoldes® (**18**). **(a)** Chromatogramm der Gelfiltration zum Entfernen von nicht umgesetztem Thio-*tris*NTA **19** und **23**. **(b)** Anionenaustauschchromatographie nach Beladung des *tris*NTA(NG)s (**17**) mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen.

Das isolierte *tris*NTA(NG) (**17**) wurde anschließend mit einem 15-fachen Überschuss an Ni<sup>2+</sup>-Ionen inkubiert, und das ungebundene Ni<sup>2+</sup> und eventuell nicht modifiziertes Nanogold® **18** wurden mittels Anionenaustauschchromatographie entfernt (**Abb. 32 b**). Im Durchfluss der Anionenaustauschchromatographie konnte keine Absorption bei 420 nm, was dem Absorptionsmaximum des Nanogoldes® entsprach, detektiert werden. Unter den gewählten Bedingungen wurde demnach das gesamte Nanogold® mit **19** umgesetzt. Bei folgenden Umsetzungen von **18** mit **19** konnte somit auf die Anionenaustauschchromatographie verzichtet werden. Ni<sup>2+</sup>-Ionen wurden in diesem Fall vor der Gelfiltration im Überschuss zugegeben und nicht komplexiertes Ni<sup>2+</sup> durch die Gelfiltration abgetrennt. Die Konzentrationsbestimmung des modifizierten Nanogoldes® **17** erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie.

Mit der durchgeführten Methode schien es möglich, die gewünschten *tris*NTA(NG)-Partikel (**17**) erfolgreich herzustellen. Für eine abschließende Charakterisierung war allerdings die Umsetzung mit einem His-getaggen Protein notwendig.

### V.3.2.3 Stabile Komplexierung des 20S Proteasoms

Die stabile und spezifische Bindung des *tris*NTA(NG)s (**17**) an den His-getaggen 20S Proteasomkomplex wurde mittels Gelfiltration untersucht (**Abb. 33**).



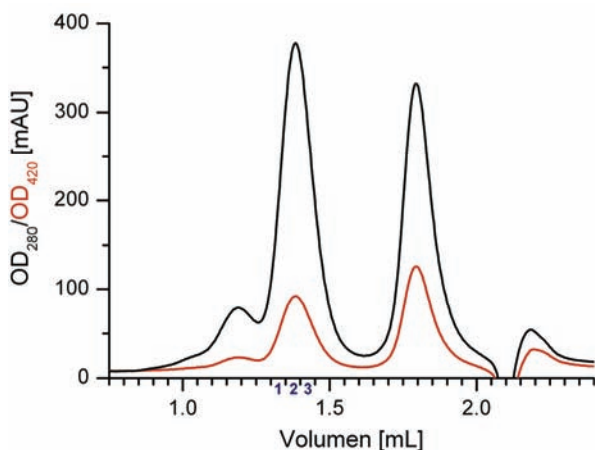
**Abb. 33:** Stabile Bindung von *tris*NTA(NG) (**17**) an das  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom nach 2 h auf Eis. Gelfiltrationsläufe vom Proteasom (125 nM) ohne (**a**) und mit (**b**) einem 4-fachen Überschuss von **17**, sowie mit **17** in Gegenwart von 100 mM Imidazol (**c**). Die Detektion erfolgte bei 280 nm (schwarz) und 420 nm (rot).

Das  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom wurde mit einem 4-fachen Überschuss an **17** für 2 h auf Eis inkubiert. Die relativ lange Inkubationszeit wurde gewählt, damit es zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen den *tris*NTA-Gruppen und den 14 His-Tags des Proteasoms kommen konnte. Das unmarkierte Proteasom eluierte bei einem Volumen von 1.41 mL (**Abb. 33 a**), das ungebundene *tris*NTA(NG) (**17**) bei 1.81 mL. Nach der Inkubation mit **17** eluierte das Proteasom bei einem Volumen von 1.38 mL und zeigte eine zusätzliche Absorption bei 420 nm (**Abb. 33 b**). Somit ließ sich zeigen, dass sich zwischen **17** und dem His-getaggen 20S Proteasom ein stabiler Komplex geformt hatte. Um nachzuweisen, dass diese Komplexbildung spezifisch über die *tris*NTA/His-Tag-

Wechselwirkung gebildet wurde, wurden die Komplexe mit 100 mM Imidazol inkubiert. Bei den anschließend durchgeführten Gelfiltrationen in Gegenwart von Imidazol wurde im Elutionspeak des Proteasoms keine Absorption bei 420 nm mehr detektiert und der Peak eluierte wieder bei einem Volumen von 1.41 mL (**Abb. 33 c**). Mit den durchgeführten Gelfiltrationen konnte gezeigt werden, dass eine stabile, spezifische und reversible Bindung zwischen dem *tris*NTA(NG) (**17**) und dem 20S Proteasom ausgebildet wurde.

#### V.3.2.4 Anzahl gebundener *tris*NTA(Nanogold®)-Partikel

Um zu bestimmen, wie viele *tris*NTA(NG)-Partikel (**17**) pro  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom gebunden waren, wurde der Komplex mittels Gelfiltration isoliert (**Abb. 34**). Von den mit blauen Zahlen gekennzeichneten Fraktionen wurde das Verhältnis des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms zu **17** mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Für das Nanogold® wurde ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{420} = 155000$  L/mol·cm bei 420 nm und ein Verhältnis der Absorptionen von 280 nm zu 420 nm von  $A_{280}/A_{420} = 2.94$  angenommen<sup>223</sup>.



**Abb. 34:** Bindung von *tris*NTA(NG) (**17**) an das  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom analysiert mittels Gelfiltration. 1.4  $\mu$ M Proteasom wurden mit 5.6  $\mu$ M **17** 2 h auf Eis inkubiert. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz) und 420 nm (rot) detektiert. Von den mit blauen Zahlen (1-3) nummerierten Fraktionen wurde das Verhältnis von Proteasom zu **17** bestimmt.

Mit den Werten wurde berechnet, welcher Anteil der Absorption bei 280 nm vom Nanogold® stammte, und die verbleibende Absorption wurde dem Proteasom ( $\epsilon_{280} = 428400$  L/mol·cm) zugerechnet. Die aus drei Messungen erhaltenen Werte sind in **Tabelle 20** angegeben.

**Tabelle 20:** Verhältnis des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms zum *tris*NTA(NG) (**17**) nach einer Gelfiltration. Die Bestimmung erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie.

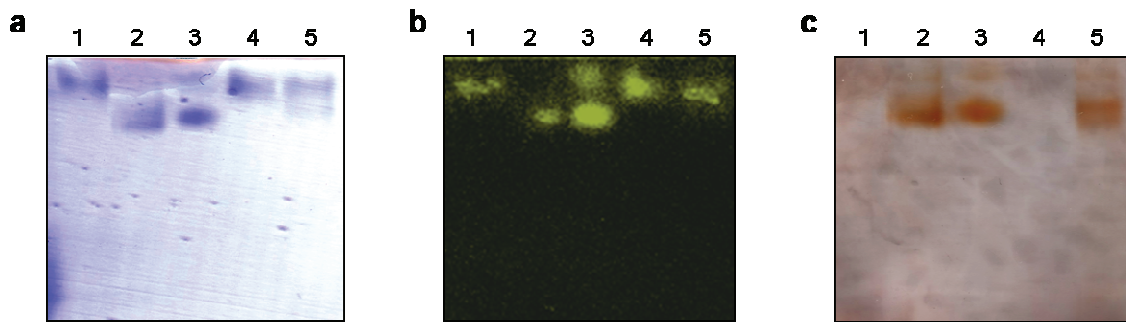
Fraktion	Verhältnis Proteasom zu <b>17</b>
1	1 : 2.4 ± 1.0
2	1 : 1.8 ± 0.1
3	1 : 2.9 ± 1.7

Daraus ergab sich für den charakterisierten Peak insgesamt ein Mittel von  $2.5 \pm 0.5$  **17** pro  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom. Der bestimmte Wert stimmte gut mit dem zu erwarten gewesenen Wert überein. Angenommen wurden zwei Goldcluster **17** pro Proteasomkomplex, weil die 14 His-*Tags* bei dem  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom an den beiden Enden der fassförmigen Struktur des Komplexes lokalisiert sind.

### V.3.2.5 Peptidaseaktivität des markierten des 20S Proteasoms

Die stabile, spezifische Markierung der  $\alpha$ N- und  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasome mit dem *tris*NTA(NG) (**17**) wurde auch mittels nativer PAGE nachgewiesen. Die native PAGE bot gegenüber der Gelfiltration den Vorteil, dass zusätzlich die proteolytische Aktivität des markierten 20S Proteasomkomplexes direkt untersucht werden konnte. Mit diesen Untersuchungen sollte aufgeklärt werden, ob das gebundene **17** einen negativen Einfluss auf die Peptidaseaktivität des Proteasomkomplexes hatte.

Die native PAGE wurde mit isolierten, unmarkierten und **17**-markierten  $\alpha$ N- und  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasomkomplexen durchgeführt. Als zusätzliche Probe wurde ein mittels Gelfiltration isolierter  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom/**17**-Komplex auf das Gel aufgetragen. Es wurden parallel zwei identische Gele mit gleicher Beladung gefahren, wobei eines für die Detektion des Nanogoldes® genutzt wurde. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit einem sogenannten *Silver-Enhancer* entwickelt, der das Nanogold® durch Anlagerung von Silber sichtbar machte. Das zweite Gel wurde für den Aktivitätstest mit dem nichtfluoreszierenden Peptid Suc-LLVT-AMC und die abschließende Coomassie-Färbung zur Visualisierung der Proteinbanden verwendet (**Abb. 35**).



**Abb. 35:** Native PAGE mit isolierten 20S Proteasomkomplexen und *tris*NTA(NG) (**17**). Das  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom (2  $\mu$ g) ohne (Spur 1) und mit 0.4 nmol **17** (Spur 2) sowie ein isolierter Komplex aus einer Gelfiltration (Spur 3) wurden auf das Gel aufgetragen. Außerdem wurde das Gel mit dem  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom (2  $\mu$ g) ohne (Spur 4) und mit 0.4 nmol **17** (Spur 5) beladen. **(a)** Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau G250. **(b)** Die Aktivität der Proteasomkomplexe wurde mit Suc-LLVT-AMC nachgewiesen. Die Fluoreszenz des AMCs wurde bei  $\lambda_{em} = 520$  nm detektiert. **(c)** Entwicklung der Nanogold®-Banden mittels *Silver-Enhancer*. Bei Abbildung **(a)** und **(b)** handelt es sich um dasselbe Gel, während es sich bei **(c)** um ein identisch beladenes Gel handelt, welches parallel laufen gelassen wurde. Dadurch erklärt sich die unterschiedliche Laufweite für Spur 5.

Die markierten Proteasomkomplexe liefen aufgrund der zusätzlichen negativen Ladungen im Gel weiter als die unmarkierten. Das In-Gel-Substrat-Überschichtungsexperiment mit Suc-LLVT-AMC, einem nichtfluoreszierenden Peptid, das durch die proteolytische Spaltung fluoreszierendes Amino-4-methylcumarin (AMC) freisetzt<sup>190</sup>, zeigte deutlich, dass sowohl die unmarkierten als auch die markierten Proteasomkomplexe proteolytisch aktiv waren. Die Bindung von **17** hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Peptidaseaktivität des 20S Proteasoms.

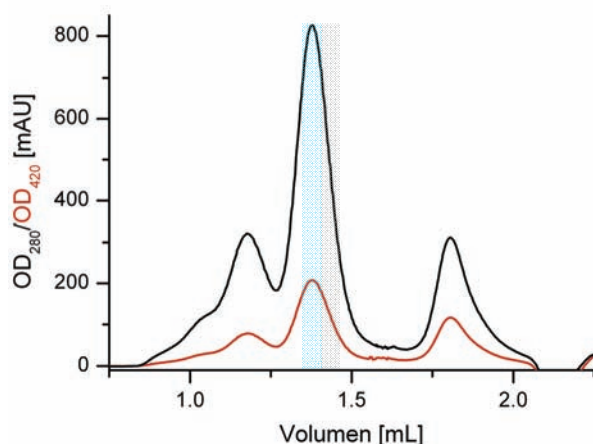
### V.3.2.6 Elektronenmikroskopie mit dem 20S Proteasom

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der mit *tris*NTA(NG) (**17**) markierten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasome wurden die Komplexe direkt vor der Durchführung mittels Gelfiltration isoliert (**Abb. 36**, hellblauer Balken) und bis zum endgültigen Einsatz auf Eis gelagert.

Die relativ hohen Konzentrationen von Proteasom (mindestens 2  $\mu$ M) und **17** (3-facher Überschuss), und die lange Inkubationszeit (über Nacht) führten teilweise zur Bildung größerer Komplexe ( $V = 1.17$  mL). Für die Elektronenmikroskopie wurden



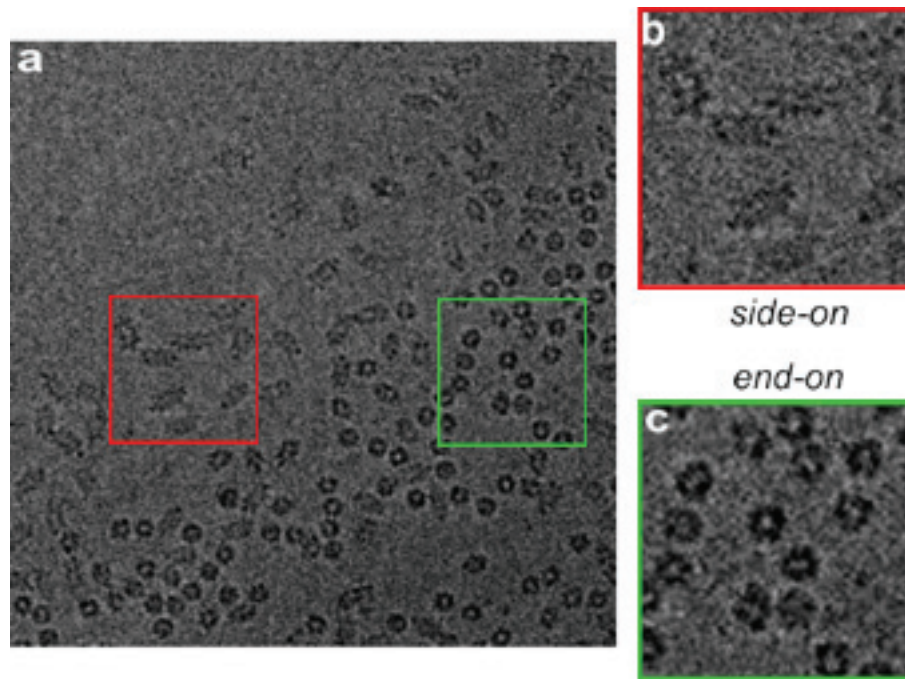
Komplexe aus dem Elutionspeak benutzt, für den ein Verhältnis von  $2.5 \pm 0.5$  *tris*NTA(NG)s (**17**) pro Proteasom bestimmt worden war.



**Abb. 36:** Typische Gelfiltration vom  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom (3  $\mu$ M), das mit drei Äquivalenten *tris*NTA(NG) (**17**) für 14 h inkubiert wurde. Die Detektion erfolgte bei 280 nm (schwarz) und 420 nm (rot). In grau und blau gekennzeichnet sind Fraktionen, die für die Elektronenmikroskopie verwendet wurde.

Die Einzelmolekül-Analysen mittels Kryo-EM wurden in Zusammenarbeit mit Dr. D. PARCEJ durchgeführt. Die Proben wurden in einem TEM mit einer 60000-fachen Vergrößerung untersucht. Aufgrund der Lokalisation der His-*Tags* am verwendeten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom war zu erwarten gewesen, dass sich das *tris*NTA(NG) (**17**) an den beiden Enden des Proteasoms befand.

In den EM-Aufnahmen wurde der Proteasomkomplex wegen seiner fassförmigen Struktur in zwei Hauptorientierungen, nämlich stehend (*end-on*) oder liegend (*side-on*), vorgefunden. Am Rand der Löcher im Grid war überwiegend die stehende Orientierung zu beobachten, während zur Mitte hin fast ausschließlich die liegende Orientierung detektiert wurde. Auffallend war auch, dass direkt in der Mitte der Löcher kaum Proteasomkomplexe gefunden werden konnten (**Abb. 37**).



**Abb. 37:** EM-Bild von mit *tris*NTA(NG) (17) markiertem  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom. **(a)** Gesamtaufnahme der Proteasomkomplexe. **(b)** Vergrößerter Ausschnitt der *side-on* orientierten Proteasome. **(c)** Vergrößerter Ausschnitt der *end-on* orientierten Proteasome.

Als Grund für diese Beobachtung kann angeführt werden, dass das Eis am Rand der Löcher stärker war als in der Mitte. Daher konnten die Proteasomkomplexe nur am Rand in einer stehenden Orientierung vorliegen, während sie zur Mitte hin liegend im Eis eingefroren wurden (**Schema 23**).

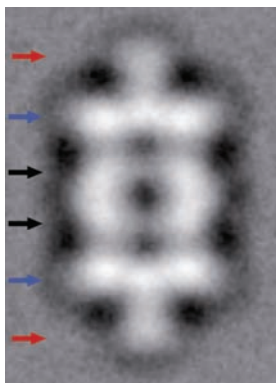


**Schema 23:** Schematische Darstellung der beobachteten Orientierungen von Proteasomkomplexen bei der Kryo-EM. In den Löchern des EM-Grids lagen wahrscheinlich verschiedene Eisstärken vor. Daher wurde am Rand eher die stehende Orientierung des Proteasoms gefunden, während es zur Mitte hin liegend detektiert werden konnte.

Bei zu dünnem Eis hingegen wurden keine Proteasomkomplexe gefunden. Für die Einzelmolekül-Studien war die liegende Orientierung des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms besser

geeignet, weil hier die *tris*NTA(NG)-Partikel (**17**) deutlich als runde Partikel an beiden Enden zu erkennen waren. Beim Einfrieren der Proben wurde daher versucht, durch die Wahl geeigneter Parameter möglichst dünnes Eis zu generieren

Bei der ersten Einzelmolekül-Analyse, die von Dr. D. PARCEJ durchgeführt worden war, wurden insgesamt 4126 Partikel in allen vorliegenden Orientierungen ausgewählt. Für die Verarbeitung der Daten wurde die *XMIPP processing suite*<sup>230</sup> verwendet. Durch eine 2D-Ausrichtung und ein Sortieren der ausgewählten Partikel mit der *Maximum-Likelihood*-Methode (ML2D) in Klassen, wurde für das mit *tris*NTA(NG) (**17**) markierte  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom ein Durchschnittsbild erzeugt (**Abb. 38**). Für dieses Bild wurden nur die *side-on* orientierten Partikel berücksichtigt, deren Projektion gerade in der Ebene liegende Partikel darstellte. Das Durchschnittsbild wurde so aus insgesamt 909 Einzelbildern generiert.



**Abb. 38:** Überlagerungsbild der ausgewählten Partikel in *side-on* Orientierung. Deutlich zu erkennen ist die Proteasomstruktur mit den zwei  $\alpha$ - (blaue Pfeile) und zwei  $\beta$ -Ringen (schwarze Pfeile), die die drei Nanokompartimente für die Proteindegradation einschließen. Außerdem erkennbar ist das *tris*NTA(NG) (**17**) (rote Pfeile) an den beiden Enden des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms.

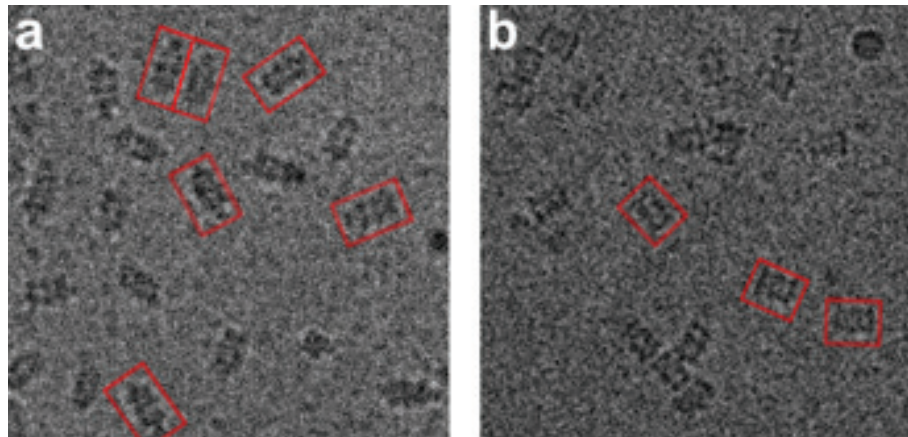
Das Durchschnittsbild der ausgewählten Einzelpartikel zeigt deutlich die Proteasomstruktur, bestehend aus zwei  $\alpha$ - (außen) und zwei  $\beta$ -Ringen (innen) sowie den drei Nanokompartimenten in denen die Degradation stattfindet. Außerdem zeigt es deutlich zusätzliche Elektronendichten an jedem Ende des Proteasoms, die durch **17** gebildet wurden. Nach der bisherigen Analyse sah es so aus, als wären alle  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasome mit zwei *tris*NTA(NG)-Partikeln (**17**) markiert.

Bei genauer Betrachtung des erhaltenen Durchschnittsbildes fallen zwei Dinge auf: (i) das Nanogold® erscheint im Vergleich zum Proteasom relativ groß, und (ii) die durch **17** erzeugten Elektronendichten an den beiden Enden des Proteasoms weisen unterschiedliche Intensitäten auf. Ein Größenvergleich machte deutlich, dass, wenn man von einem Durchmesser des Proteasoms von etwa 11 nm ausgeht, **17** eine scheinbare Größe von 3-4 nm hatte. Diese Beobachtung ließ sich damit erklären, dass die exakte

Position von **17** am Proteasom nicht fixiert ist, sondern von Partikel zu Partikel leicht schwanken kann. Durch das Zusammenfügen der Bilder zu einem Durchschnittsbild erscheint **17** größer, als es in Wirklichkeit ist. Aufgrund der hohen Anzahl an His-*Tags* ist auch eine mehrfache Markierung pro Proteasomhälfte denkbar und kann nicht komplett ausgeschlossen werden. Solche Partikel würden ebenfalls zu einer vergrößerten, unregelmäßigen Darstellung von **17** beitragen.

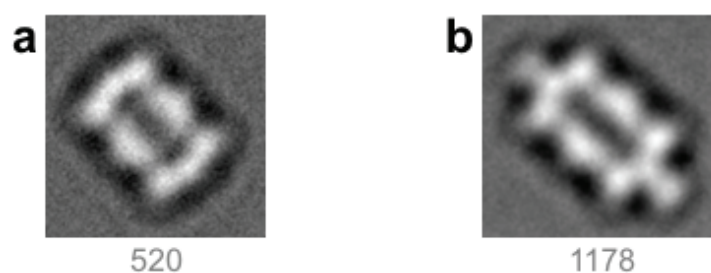
Die Bindung von zwei *tris*NTA(NG)-Partikeln (**17**) pro Proteasomkomplex stimmte gut mit dem Ergebnis aus der UV/Vis-Spektroskopie überein. Trotzdem war es unwahrscheinlich, dass nicht auch mehrfach-, einfach- oder unmarkierte Proteasome zu finden waren. Da die meisten Proben nicht direkt nach der Gelfiltration auf ein EM-Grid aufgebracht werden konnten, sondern noch mindestens 1 h auf Eis standen, könnte eine partielle Dissoziation stattgefunden haben. Um zu ermitteln, ob sich unter den 909 ausgewählten Partikeln mehrfach-, einfach- oder unmarkierte Partikel befanden, wurden verschiedene Methoden zur Klassifizierung, mit und ohne künstlich generierte Referenzen, getestet. Mit keiner der verwendeten Methoden konnte allerdings quantifiziert werden, wie viel Prozent der Proteasomkomplexe wirklich mit zwei *tris*NTA(NG)-Partikeln (**17**) markiert waren.

In der folgenden Studie sollte ein experimenteller Vergleich mit unmarkierten Proteasomkomplexen zeigen, ob die Software doppelt-, einfach- und unmarkierte Partikel unterscheiden konnte. Dazu wurden erneut Kryo-EM Aufnahmen mit dem **17**-markierten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom durchgeführt. Um die Wahrscheinlichkeit auf einfach- oder unmarkierte Partikel zu erhöhen, wurde eine spätere Fraktion der Gelfiltration verwendet (**Abb. 36**; hellgrauer Balken). Für die unmarkierte Referenz wurden Aufnahmen vom  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom angefertigt (**Abb. 39**).



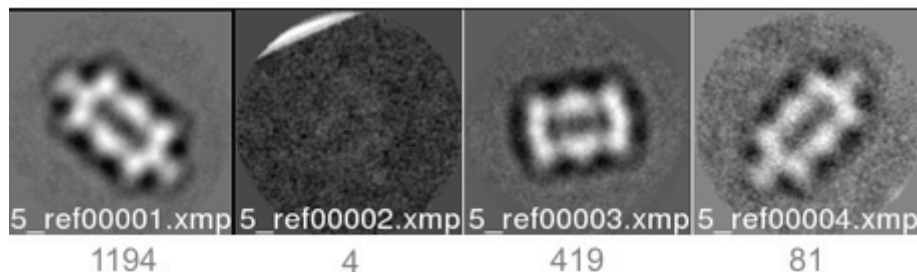
**Abb. 39:** Kryo-EM Aufnahme von markierten und unmarkierten Proteasomkomplexen. **(a)**  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasome mit *tris*NTA(NG) (**17**). **(b)** Unmarkierte  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasome. Die roten Kästen markieren beispielhaft Partikel, die für die Einzelmolekül-Analyse ausgewählt wurden. Der Unterschied in der äußeren Erscheinungsform, der durch die Markierung mit **17** hervorgerufen wird, ist klar erkennbar.

Von dem markierten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom wurden 2773 Partikel und von dem unmarkierten  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasom 520 Partikel in der *side-on* Orientierung ausgewählt. Für das Durchschnittsbild des unmarkierten Proteasomkomplexes wurden die ausgewählten Einzelpartikel in 2D ausgerichtet (**Abb. 40 a**). Die 2773 Partikel des markierten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms wurden nach der ML2D-Methode in Klassen aufgeteilt, um falsch orientierte Partikel auszusortieren. Von den so entwickelten Klassen wurde die mit dem symmetrischsten Durchschnittsbild, bestehend aus 1178 Einzelpartikeln, für die weiteren Analysen verwendet (**b**).



**Abb. 40:** Durchschnittsbilder des **(a)** unmarkierten  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasoms und des **(b)** *tris*NTA(NG) (**17**)-markierten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms. Angegeben ist die Anzahl der verwendeten Einzelpartikel.

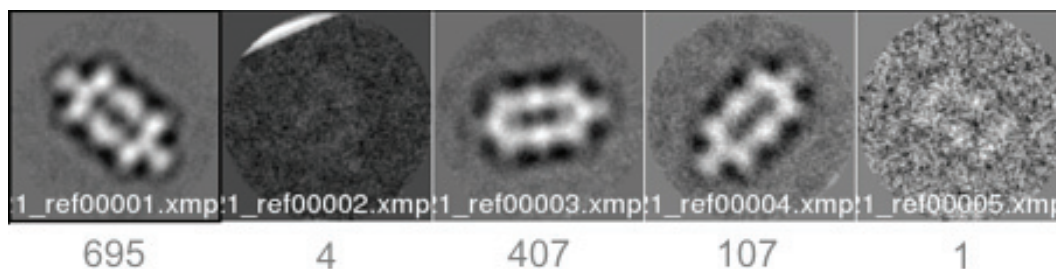
Die Partikel (520 vom unmarkierten, 1178 vom markierten Proteasom) wurden miteinander vermischt und es wurde eine neue Klassifizierung nach der ML2D-Methode durchgeführt (**Abb. 41**).



**Abb. 41:** Klassifizierung der unmarkierten und mit *tris*NTA(NG) markierten Proteasompartikel. Die Einteilung in Klassen erfolgte nach der ML2D-Methode. Angegeben ist die Anzahl der Einzelpartikel pro Klasse.

Von den gebildeten Klassen enthielt nur eine (**Abb. 41**; Klasse 3) ausschließlich unmarkierte Proteasomkomplexe. In dieser Klasse waren allerdings nur 419 statt mindestens 520 Partikel zu finden. Daraus wurde geschlossen, dass die Software mit dieser Methode die Partikel nicht 100%-ig unterscheiden konnte.

In einem weiteren Ansatz wurde die ML2D-Methode mit der Vorgabe von Referenzen durchgeführt. Als Referenzen dienten die vier Überlagerungsbilder der zuvor erzeugten Klassen (**Abb. 41**). Außerdem wurden von Hand zwei Partikel ausgesucht, bei denen es sich wahrscheinlich um einfach markierte Proteasomkomplexe handelte. Aus ihnen wurde ein 2D-ausgerichtetes Durchschnittsbild generiert, welches als fünfte Referenz eingesetzt wurde. Es folgte die Klassifizierung mit den 1178 *tris*NTA(NG) (17)-markierten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasompartikeln (**Abb. 42**).



**Abb. 42:** Klassifizierung der markierten  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasompartikel nach der ML2D-Methode mit vorgegebenen Referenzen. Angegeben ist die Anzahl der Einzelpartikel pro Klasse.

Am auffälligsten war das entstandene Durchschnittsbild der Klasse 3, das ausgehend von einer vollkommen unmarkierten Referenz gebildet worden war. Der Klasse waren eindeutig *tris*NTA(NG) (17)-markierte Partikel zugeordnet worden. Die ungleichmäßigen und schwachen Elektronendichten, die durch 17 erzeugt wurden, sprachen allerdings dafür, dass durchaus einfach- oder unmarkierte Partikel in dieser Klasse enthalten waren. Mit der Methode konnte demnach keine Klassifizierung der Partikel nach ihrem Markierungsgrad erfolgen. Auch mit der sogenannten SOM-Methode (*self organizing map*) konnte keine sichere Klassifizierung der Einzelpartikel erreicht werden. Weitere Versuche, die Menge einfach- oder unmarkierter Proteasomkomplexe zu quantifizieren wurden nicht unternommen.

Die Beobachtung, dass mehrfach-, doppelt-, einfach- und unmarkierte Partikel nicht voneinander unterschieden werden konnten, hängt offensichtlich mit der hohen Symmetrie des Proteasomkomplexes zusammen. Bei un- und doppelt markierten Partikeln wird durch eine 180° Drehung wieder das Ausgangspartikel erhalten. Auch passen einfach- oder unmarkierte Partikel auf ein zweifach markiertes Partikel, weil die Elektronendichte des Proteasoms immer identisch bleibt. Durch die Bildung eines Durchschnittsbildes aus einer Mischung von unmarkierten sowie ein-, doppelt- und mehrfach markierten Partikeln entstehen die unterschiedlichen Intensitäten für das *tris*NTA(NG) (17). Im Vergleich zum Proteasomkomplex lieferte das Nanogold® scheinbar eine zu geringe Elektronendichte, um sie zum Klassifizieren der Einzelpartikel nutzen zu können.

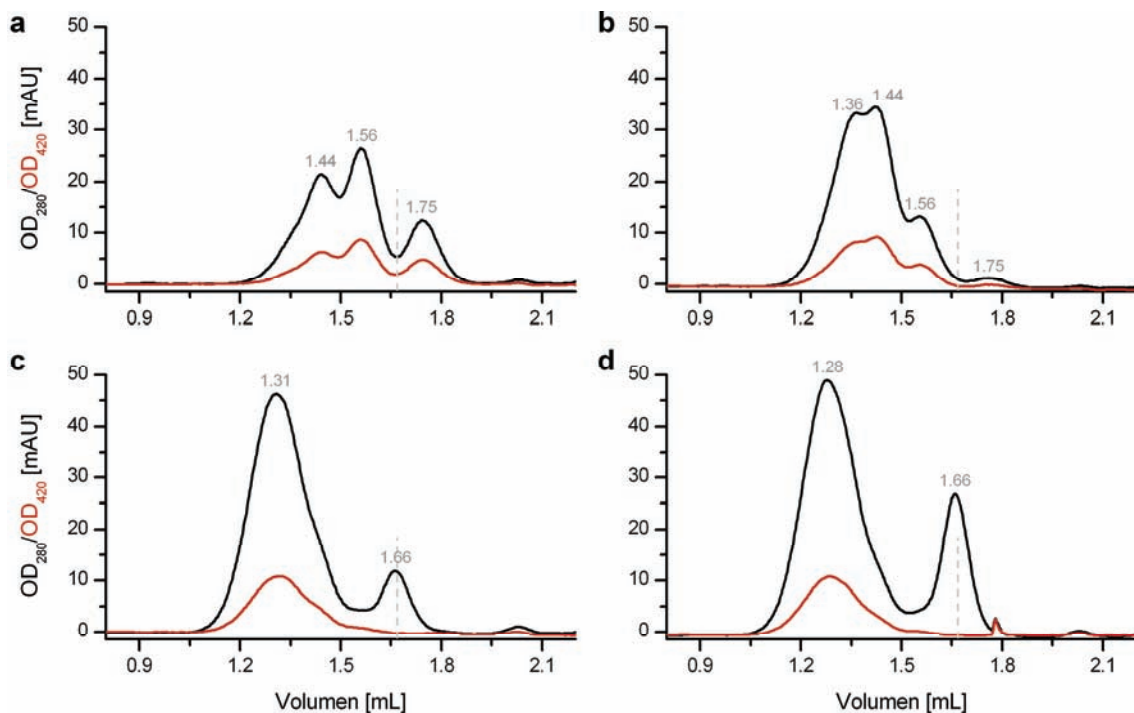
Nach Abschluss der elektronenmikroskopischen Untersuchungen sollte das *tris*NTA(NG) (17) in Hinblick auf seine Bindungseigenschaften genauer untersucht werden. Bei der Gelfiltration mit dem  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasom hatte sich gezeigt, dass es im Laufe der Zeit bei hohen Konzentrationen zur Bildung größerer Komplexe kam (**Abb. 36**; V = 1.17 mL). Der Grund für diese Beobachtung sollte untersucht werden.

### V.3.2.7 Stabile Komplexbildung mit MBP-H<sub>6</sub>

Es wurden verschiedene Ansätze unternommen, um die Affinität des *tris*NTA(NG)s (17) für einen His-Tag definierter Länge zu bestimmen. Dazu wurden Fluoreszenzanisotropiemessungen und Fluoreszenztitrationen mit fluoreszenten, His-getagten Proteinen und His-Peptiden durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen schwankten stark und waren nicht reproduzierbar. Um zu überprüfen, ob das

verwendete **17** wirklich monofunktionalisiert war, wurden daher Gelfiltrationen mit MBP-H<sub>6</sub> durchgeführt. Bei der *tris*NTA/His<sub>6</sub>-Wechselwirkung wird bekanntermaßen ein definierter 1:1 Komplex gebildet<sup>94</sup>.

Für die Gelfiltration wurde **17** mit ein, zwei, vier und sechs Äquivalenten MBP-H<sub>6</sub> für 30 min inkubiert (**Abb. 43**).



**Abb. 43:** Gelfiltrationen von *tris*NTA(NG) (**17**) mit MBP-H<sub>6</sub>. **17** (500 nM) wurde für 30 min mit 1 (**a**), 2 (**b**), 4 (**c**) und 6 (**d**) Äquivalenten MBP-H<sub>6</sub> inkubiert. Das Volumen von unmarkiertem MBP-H<sub>6</sub> ist als graue Linie dargestellt, **17** eluierte bei 1.75 mL. Die einzelnen Peaks sind aus Übersichtlichkeitsgründen mit ihren jeweiligen Elutionsvolumina gekennzeichnet.

Die Gelfiltrationen zeigten eindeutig, dass kein definierter 1:1 Komplex gebildet worden war. Bei einem stöchiometrischen Verhältnis von **17** zu MBP-H<sub>6</sub> wurden drei verschiedene Peaks detektiert, wobei freies **17** bei einem Volumen von 1.75 mL eluierte (**Abb. 43 a**). Bei einer einzigen *tris*NTA-Gruppe auf der Oberfläche des Nanogoldes® wären ein einziger Elutionspeak und kein freies **17** detektierbar gewesen. Durch die Erhöhung der MBP-Konzentration verschoben sich die Elutionspeaks zu geringerem Volumen, d.h. zu größeren Komplexen. Bei der höchsten MBP-Konzentration wurde neben freiem MBP-H<sub>6</sub> ( $V = 1.66$  mL) ein breiter Peak mit scheinbar unterschiedlich stark markiertem MBP-H<sub>6</sub> detektiert (**Abb. 43 d**). Ungebundenes **17** konnte ab vier



Äquivalenten MBP-H<sub>6</sub> nicht mehr detektiert werden. Diese Beobachtungen ließen zwei Schlussfolgerungen zu: (i) **17** verfügte über mehr als eine einzelne *tris*NTA-Gruppe auf der Oberfläche, oder (ii) **17** band unspezifisch an das MBP-H<sub>6</sub>. Die Spezifität der Bindung über die *tris*NTA/His-Tag-Wechselwirkung wurde durch die Zugabe von Imidazol demonstriert. In Gegenwart von 50 mM Imidazol wurde keine Komplexbildung zwischen dem MBP-H<sub>6</sub> und dem *tris*NTA(NG) (**17**) beobachtet, wodurch eine unspezifische Wechselwirkung ausgeschlossen werden konnte. Dadurch wurde bestätigt, dass **17** mehr als eine *tris*NTA-Gruppe auf der Oberfläche exponiert hatte.

Durch die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit globulären Standardproteinen definierter Größe sollte das wahrscheinlichste Verhältnis von **17** zu MBP-H<sub>6</sub> in den einzelnen Elutionspeaks ermittelt werden (**Tabelle 21**). Bei einer solchen Bestimmung ist zu beachten, dass Moleküle bei der Gelfiltration anhand ihres hydrodynamischen Radiuses und nicht nur aufgrund ihrer Masse getrennt werden. In welchem Maße die *tris*NTA(NG)/MBP-H<sub>6</sub>-Komplexe eine globuläre Struktur aufweisen, kann hier nicht spezifiziert werden. Desweiteren wurde davon ausgegangen, dass über das MBP-H<sub>6</sub> keine Quervernetzung von **17** stattfinden konnte, weil nur ein His-Tag vorhanden war.

**Tabelle 21:** Wahrscheinlichste Komplexe zwischen *tris*NTA(NG) (**17**) und MBP-H<sub>6</sub>. Die Bestimmung wurde mittels Gelfiltration durchgeführt.

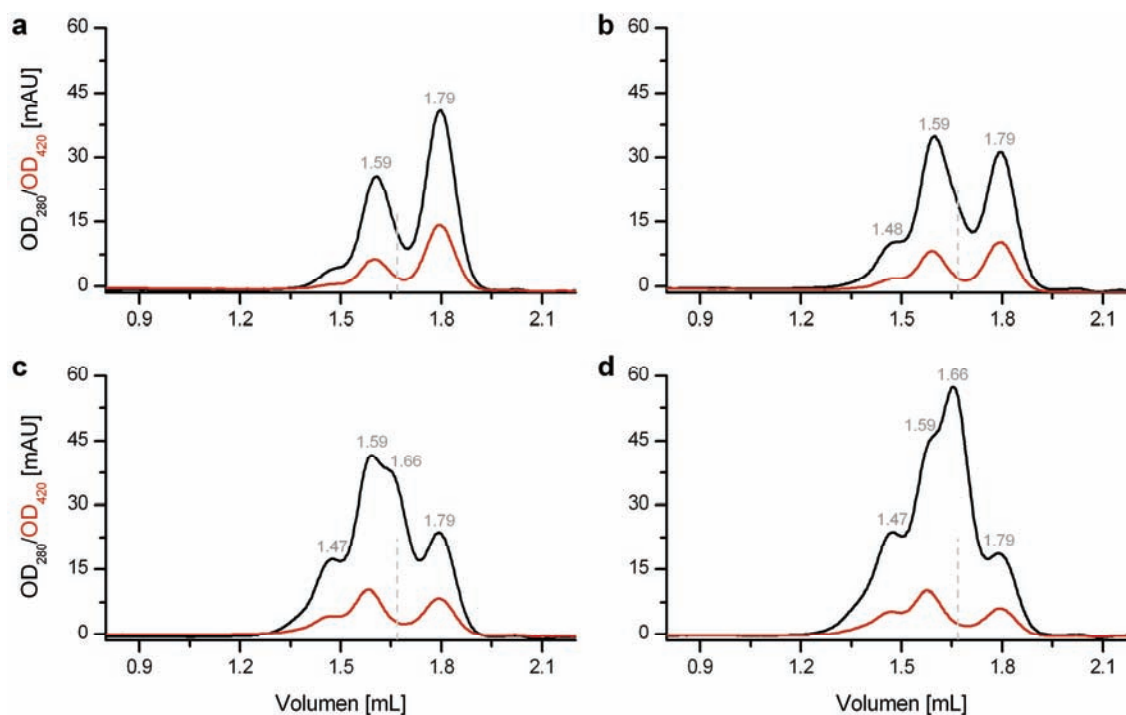
V [mL]	MW [kDa] <sup>a</sup>	Verhältnis <b>17</b> zu MBP-H <sub>6</sub> <sup>b</sup>	Substanz
1.28	249.3	1 : 6	
1.31	216.3	1 : 5	
1.36	170.7	1 : 4	
1.44	122.6	1 : 3	
1.56	66.2	1 : 1	
1.66	41.3	0 : 1	MBP-H <sub>6</sub>
1.75	27.0	1 : 0	<b>17</b>

<sup>a</sup>) Die Molekulargewichte wurden durch eine Kalibrierung der Superdex™ 200 PC 3.2/30 Säule mit globulären Proteinen ermittelt. <sup>b</sup>) Angegeben ist das wahrscheinlichste Verhältnis.

Auffällig war, dass freies **17** bei einem deutlich höheren Molekulargewicht eluierte, als erwartet worden war. Vom Hersteller angegeben sind 15 kDa, gefunden wurden 27 kDa. Diese Beobachtung wies darauf hin, dass die *tris*NTA(NG)-Partikel (**17**) einen großen hydrodynamischen Radius besaßen. Die Molekulargewichte der gebildeten Komplexe hingegen waren geringer, als es zu erwarten gewesen wäre, wenn die ermittelten molekularen Massen der Einzelkomponenten addiert worden wären. Dieser Umstand ließ sich damit erklären, dass der hydrodynamische Radius von **17** durch die Komplexbildung eines His-getaggt Proteins stark abnahm. Zu erkennen war, dass bis zu sechs MBPs pro **17** gebunden werden konnte.

Für die Beobachtung, dass Monomaleimido-Nanogold® (**18**) mit mehr als einer *tris*NTA-Gruppe modifiziert worden war, gab es folgende mögliche Erklärungen: (i) das kommerziell erhältliche **18** wies mehr als nur eine Maleimidofunktion auf der Oberfläche auf; (ii) während der Inkubation kam es an der Partikeloberfläche zu einem Austausch der Triarylphosphinliganden gegen das Thio-*tris*NTA (**19**). Der Austausch solcher Triarylphosphinliganden gegen Mercaptansäuren wurde bereits beschrieben und dauerte in wässriger Lösung bei einem 90 bis 200-fachen molaren Überschuss an Thioverbindung zwischen 2 und 7 h<sup>231</sup>. Auch wenn bei der Umsetzung von **18** nur ein maximal 20-facher Überschuss an **19** verwendet worden war, so kann doch, aufgrund der langen Reaktionszeit von 20 h, ein Austausch der Liganden stattgefunden haben.

Auch wenn das *tris*NTA(NG) (**17**) mehrere Funktionalitäten auf der Oberfläche hatte, so wurde trotzdem die Stabilität der Komplexbildung mit der des kommerziell erhältlichen Ni-NTA-Nanogoldes® (**16**) verglichen. Zu diesem Zweck wurden auch mit **16** Gelfiltrationen mit ein, zwei, vier und sechs Äquivalenten MBP-H<sub>6</sub> durchgeführt (**Abb. 44**).



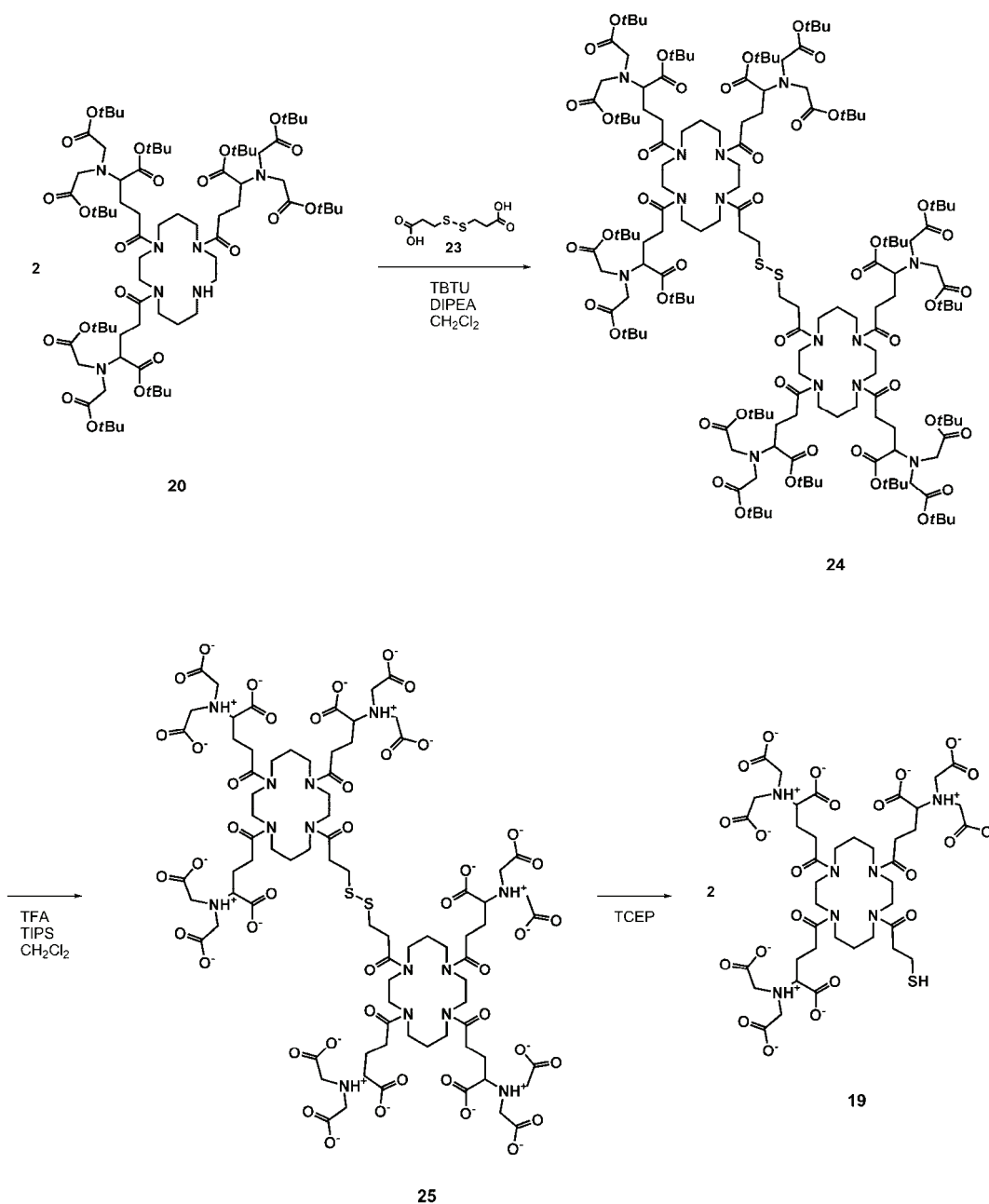
**Abb. 44:** Gelfiltrationen von Ni-NTA-Nanogold® (**16**) mit MBP-H<sub>6</sub>. **16** (500 nM) wurde für 30 min mit 1 (**a**), 2 (**b**), 4 (**c**) und 6 (**d**) Äquivalenten MBP-H<sub>6</sub> inkubiert. Das Retentionsvolumen von unmarkiertem MBP-H<sub>6</sub> ist als graue Linie dargestellt, **16** eluierte bei 1.79 mL. Zur Verbesserung der Übersicht sind die einzelnen Peaks mit den Retentionsvolumina gekennzeichnet.

Im Gegensatz zu **17** war auffällig, dass, egal wie viel MBP-H<sub>6</sub> eingesetzt worden war, immer ein Teil von **16** ungebunden vorlag ( $V = 1.79$  mL). **16** wies somit eine deutlich geringere Affinität für den His<sub>6</sub>-Tag des MBPs auf als **17**. Insgesamt waren die gebildeten Komplexe auch kleiner als mit **17**, was durch die höheren Elutionsvolumina erkennbar war. Die Spezifität der Bindung zwischen den *mono*NTA-Gruppen auf der Goldoberfläche und dem His-Tag des MBPs wurde durch die Zugabe von Imidazol demonstriert. In Gegenwart von 20 mM Imidazol konnten keine Komplexe mehr detektiert werden. Damit zeigte sich eindeutig, dass die mit **16** gebildeten Komplexe weniger stabil waren als die, die mit **17** gebildet worden waren. Hier wurden 50 mM Imidazol benötigt, um eine Komplexbildung vollständig zu unterdrücken.

Auch wenn es nicht gelungen war, monofunktionalisiertes *tris*NTA(NG) (**17**) zu synthetisieren, so ließ sich das hohe Potential der Partikel besonders für die EM deutlich erkennen. Um **17** mit einer einzelnen *tris*NTA-Gruppe auf der Oberfläche darstellen zu können, wurden neue Synthesebedingungen und Reinigungsschritte getestet.

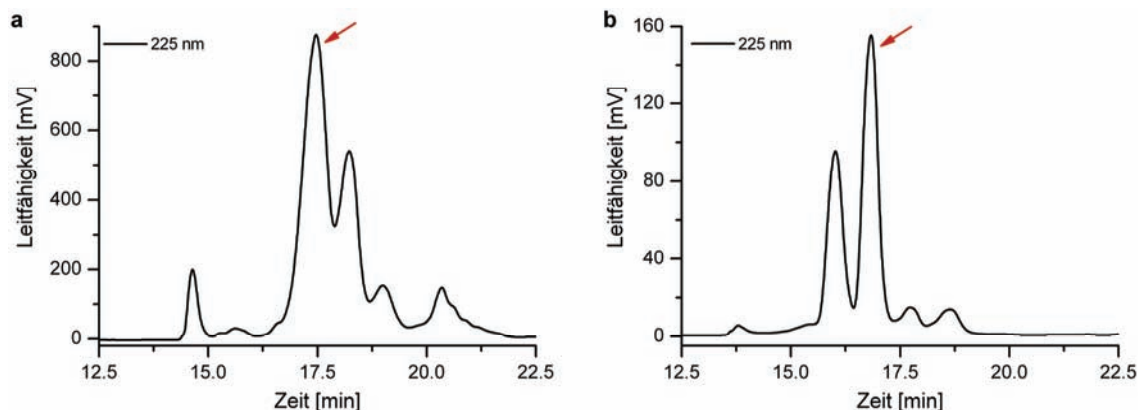
### V.3.2.8 Synthese von Thio-*tris*NTA mit 3,3'-Dithiopropionsäure

Ein wichtiger Schritt bei der Herstellung von monofunktionalisiertem *tris*NTA(NG) (**17**) war die Synthese von reinem Thio-*tris*NTA (**19**). Sobald **19** in reiner Form vorlag, könnte es in stöchiometrischen Mengen mit den Monomaleimido-Nanogold® (**18**) umgesetzt werden. Dies würde einen Austausch der Liganden auf der Partikeloberfläche verhindern. Um **19** in reiner Form zu erhalten, wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt. Dazu wurde das *tris*NTA(OtBu) (**20**) mit 3,3'-Dithiopropionsäure (**23**) umgesetzt (**Abb. 45**).



**Abb. 45:** Darstellung von Thio-*tris*NTA (**19**) aus *tris*NTA(OtBu) (**20**) und 3,3'-Dithiopropionsäure (**23**).

Durch eine anschließende Entschützung des *t*Bu-geschützten Dimers (**24**) mit TFA, Reduktion mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und Reinigungen mittels RP-HPLC konnte **19** erfolgreich in reiner Form isoliert werden (**Abb. 46**).



**Abb. 46:** Reinigung von Thio-*tris*NTA (**19**). RP-HPLC Chromatogramme der Isolierung von (a) 3,3'-Dithiopropionsäure-*tris*NTA (**25**) und (b) **19** nach Reduktion mit TCEP. Die Pfeile kennzeichnen die jeweiligen Produktpeaks.

Durch die Änderung der Synthese war es möglich, das Thio-*tris*NTA (**19**) über drei Stufen erfolgreich darzustellen. Im nächsten Schritt wurde die Umsetzung mit dem Monomaleimido-Nanogold® (**18**) vorgenommen.

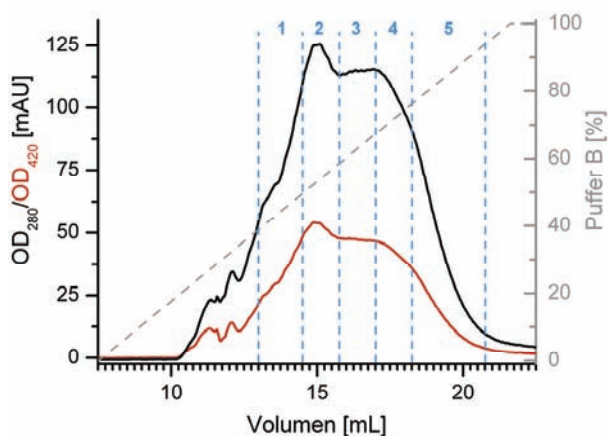
### V.3.2.9 Darstellung von *tris*NTA(NG)

Das Monomaleimido-Nanogold® (**18**) wurde mit der äquimolaren Menge des sauber isolierten Thio-*tris*NTAs (**19**) für 15 min bei Raumtemperatur umgesetzt. Durch die kurze Reaktionszeit sollte ein möglicher Austausch der Liganden auf der Oberfläche des Nanogoldes® verhindert werden. Das Nanogold® wurde anschließend mittels Gelfiltration isoliert und mit einem Überschuss an Ni<sup>2+</sup>-Ionen inkubiert.

Für die sich anschließende Reinigung wurden zwei verschiedene Strategien getestet. In der ersten Methode wurden die überschüssigen Ni<sup>2+</sup>-Ionen mittels Pufferwechsel in einem Konzentrator entfernt. Um möglicherweise nicht umgesetztes Nanogold® (**18**) abzutrennen, wurde das *tris*NTA(NG) (**17**) auf eine selbst hergestellte His<sub>6</sub>-Säule gegeben. Als Laufpuffer wurde ein HBS-Puffer ohne und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Imidazol verwendet. Es konnten weder durch Waschen mit HBS-Puffer noch durch 20 oder 50 mM Imidazol Goldcluster **17** von der Säule eluiert

werden. Durch eine Konzentration von 100 mM Imidazol war es möglich, einen Teil von **17** zu eluieren, während ein zweiter Teil mit 500 mM Imidazol eluierte. Obwohl deutlich sichtbar Material auf der Säule zurückblieb, konnte auch durch eine noch höhere Imidazolkonzentration oder EDTA keine weitere Elution erreicht werden.

Da sich die Reinigung mittels His<sub>6</sub>-Säule als ungeeignet erwies, wurde in der zweiten Methode zum Abtrennen nicht modifizierter Goldcluster **18** und überschüssiger Ni<sup>2+</sup>-Ionen eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Im Durchfluss während des Beladens der Säule wurde nur eine geringe Absorption bei 280 und 420 nm detektiert. Für die anschließende Elution wurde ein langer Gradient (20 Säulenvolumina) gewählt, um eine Auftrennung der Goldcluster in ein- und mehrfach funktionalisiertes *tris*NTA(NG) (**17**) zu erreichen (**Abb. 47**).



**Abb. 47:** Elution des *tris*NTA(NG)s (**17**) von einem Anionenaustauscher. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz) und 420 nm (rot) detektiert. Fraktionen zwischen zwei hellblauen Linien wurden vereinigt.

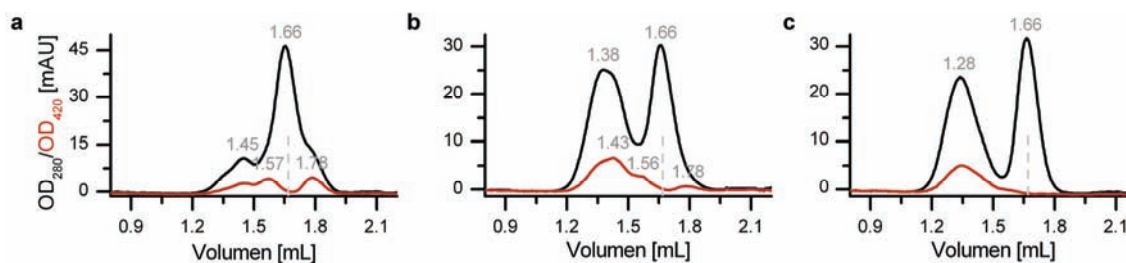
Bei der Elution von **17** vom Anionenaustauscher wurden keine scharfen Peaks erhalten. Daher wurden Fraktionen aus den verschiedenen Bereichen der Elution vereinigt (**Abb. 47**; blaue Linien). Diese wurden für die weiteren Versuche verwendet.

Mit keiner der beiden Methoden war es möglich gewesen, einheitlich modifizierte Goldpartikel zu erhalten. Um zu überprüfen, ob eine Abtrennung monofunktionalisierter *tris*NTA(NG)-Partikel (**17**) gelungen war, wurden erneut Gelfiltrationen mit MBP-H<sub>6</sub> durchgeführt. Dazu wurden die verschiedenen Fraktionen an **17**, die mit den beiden unterschiedlichen Methoden erhalten worden waren, mit zehn Äquivalenten MBP-H<sub>6</sub> für 30 min inkubiert.

### V.3.2.10 Stabile Komplexierung von MBP-H<sub>6</sub>

Aus der Reinigung über die His<sub>6</sub>-Säule wurden zwei Fraktionen von **17** erhalten: 1. die Goldcluster, die mit 100 mM Imidazol eluiert worden waren, 2. die Goldcluster, die mit 500 mM Imidazol eluiert worden waren. In Gelfiltrationen mit MBP-H<sub>6</sub> zeigten sich keine merklichen Unterschiede. Bei beiden Fraktionen wurde ungebundenes *tris*NTA(NG) (**17**) detektiert, wobei der Anteil bei der 1. Fraktion etwas höher war. Auch der Anteil an wahrscheinlichen 1:1 Komplexen von **17** zu MBP-H<sub>6</sub> war hier etwas höher, allerdings wurden auch größere Komplexe detektiert. Bei der 2. Fraktion war die Bildung größerer Komplexe etwas ausgeprägter.

Nach der Anionenaustauschchromatographie wurden fünf verschiedene Fraktionen erhalten (**Abb. 47**). Außerdem wurde der Durchfluss aufkonzentriert und eingesetzt. Bei dieser Probe fand keine Bindung des Nanogoldes® an das MBP-H<sub>6</sub> statt. Es handelte sich also um nicht modifiziertes Monomaleimido-Nanogold® (**18**). Bei den anderen fünf Fraktionen sahen die Chromatogramme für Fraktionen 1 und 2 sowie 4 und 5 nahezu identisch aus. Daher sind in **Abb. 48** die Chromatogramme für die Fraktionen 1, 3 und 4 gezeigt.



**Abb. 48:** Stabile Komplexbildung zwischen *tris*NTA(NG) (**17**) und MBP-H<sub>6</sub> analysiert mittels Gelfiltration. Die drei Proben von **17** (250 nM) wurden 30 min mit 10 Äquivalenten MBP-H<sub>6</sub> inkubiert. **(a)** Fraktion 1 aus der Anionenaustauschchromatographie, **(b)** Fraktion 3 und **(c)** Fraktion 4. Das Elutionsvolumen von unmarkiertem MBP-H<sub>6</sub> ist als graue Linien dargestellt, ungebundenes **17** eluierte bei 1.78 mL. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die einzelnen Peaks mit ihren Elutionsvolumina gekennzeichnet.

Die Gelfiltrationen zeigten deutlich, dass auch unter den geänderten Bedingungen kein einheitlich monofunktionalisiertes *tris*NTA(NG) (**17**) gebildet worden war. In den frühen Fraktionen 1 und 3 konnte neben wenigen 1:1 Komplexen ( $V = 1.57$  mL) ungebundenes **17** detektiert werden. Ab Fraktion 3 wurden aber deutlich mehr größere Komplexe als die gewünschten 1:1 Komplexe gebildet. Je später eine Fraktion vom Anionenaustauscher eluiert war, desto mehr und größere Komplexe wurden gebildet.

Die Tatsache, dass auch mit stöchiometrischen Mengen an Thio-*tris*NTA (**19**) und kurzen Reaktionszeiten kein einheitlich monofunktionalisiertes *tris*NTA(NG) (**17**) erhalten werden konnten, legt den Schluss nahe, dass das kommerzielle Monomaleimido-Nanogold® (**18**) teilweise mehr als eine einzelne Maleimidogruppe auf der Oberfläche exponierte. Für kleinere Goldcluster ( $\text{Au}_{11}$  und  $\text{Au}_{55}$ ) ist beschrieben, dass die Monofunktionalisierung durch einen Ligandenaustausch mit einer angepassten Mischung aus Tris-*p-N*-methylcarboxamidophenylphosphin ( $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{CONHCH}_3)_3$ ) und *p-N*-Aminopropylcarboxamidophenyl-di-*p-N*-methylcarboxamidophenylphosphin ( $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{CONHCH}_3)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2)$ ) realisiert wird. Durch eine Kationenaustauscherchromatographie werden die Goldcluster nach Anzahl ihrer funktionellen Amine aufgetrennt und anschließend zum Maleimidoderivat umgesetzt<sup>232</sup>. Bei der Reinigung kann nicht zu 100% garantiert werden, dass es sich um monofunktionalisierte Goldcluster handelt. Die Monofunktionalisierung wird lediglich durch Umsetzung mit Proteinen experimentell bestätigt. Da die Proteine im Vergleich zum Nanogold® relativ groß sind, kann die Bindung allerdings unbemerkt über mehrere funktionelle Gruppen stattfinden. Auch ein Blockieren nicht umgesetzter, funktioneller Gruppen aufgrund der Größe des Proteins ist denkbar. Die Verwendung eines Überschusses des Nanogoldes® bei der Umsetzung, wie empfohlen, bevorzugt außerdem die Bildung von 1:1 Komplexen.

### V.3.3 Schlussfolgerung

Eine Darstellung von monofunktionalisiertem *tris*NTA(NG) (**17**) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht verwirklicht werden. Das unter den verschiedenen, vorgestellten Bedingungen synthetisierte **17** zeigte aber das hohe Potential der Partikel für die elektronenmikroskopische Analyse von Proteinen. Wichtig ist, dass eine Separation der gewünschten Komplexe mittels Gelfiltration erreicht werden kann. Dabei sollte die Verwendung eines Unterschusses an His-*getaggt*em Protein die Bildung definierter 1:1 Komplexe unterstützen. Die hohe Stabilität der spezifischen Bindung über das *tris*NTA garantiert die stabile Markierung der Proteine über einen langen Zeitraum hinweg.

Die Tatsache, dass mittels Einzelpartikel-Analyse keine eindeutige Klassifizierung der Partikel erfolgen konnte, hing mit der hohen Symmetrie des verwendeten 20S Proteasomkomplexes zusammen. Bei weniger symmetrischen Proteinen sollte eine solche Analyse ohne Probleme durchführbar sein.



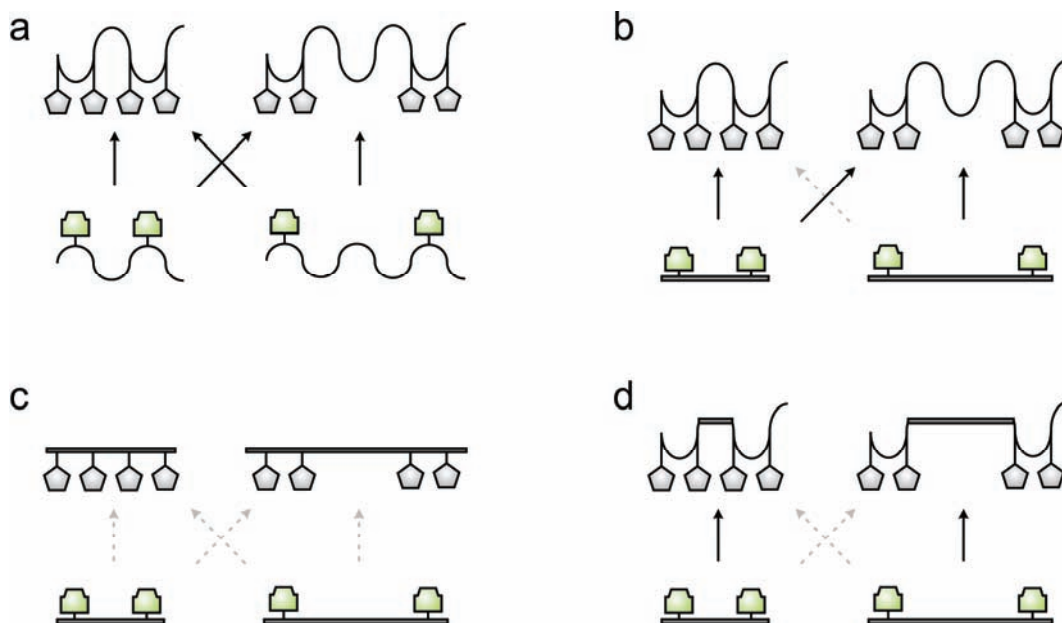
### V.3.4 Ausblick

Ziel war es, monofunktionalisiertes *tris*NTA(NG) (**17**) für die Identifikation His-*getaggtter* Proteinuntereinheiten in makromolekularen Komplexen mittels EM zu synthetisieren. Die vorgestellten Partikel können, auch wenn sie mehr als eine *tris*NTA-Gruppe auf der Oberfläche exponieren, zu diesem Zweck sehr gut eingesetzt werden. Allerdings wäre der Zugang zu monofunktionalisiertem **17** wichtig, um Proteine mit einem einzigen His-*Tag* ohne auftretende Vernetzungen untersuchen zu können. Die Charakterisierung der letzten Partikel mit MBP-H<sub>6</sub> hat gezeigt, dass durchaus monofunktionalisiertes *tris*NTA(NG) (**17**) erhalten worden war. Durch eine Optimierung der Nanogold®-Modifikation und besonders der anschließenden Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie sollte der Anteil an monofunktionalisiertem **17** erhöht werden können. Durch solche Goldcluster wäre die stabile, spezifische und einheitliche Markierung His-*getaggtter* Proteine garantiert. Die Bildung definierter Komplexe würde die Charakterisierung von Proteinen mittels EM deutlich erleichtern.

## V.4 Orthogonale *bis*NTAs

### V.4.1 Hintergrund

Die Idee hinter diesem Projekt bestand darin, orthogonale His-Tag/NTA-Bindungspaare zu generieren. Die Möglichkeit, Proteine orthogonal z.B. mit verschiedenen Fluorophoren zu markieren oder strukturiert zu immobilisieren würde große Vorteile für deren Charakterisierung mit sich bringen. Ein bestimmter MCH sollte demnach eine hohe Affinität für einen bestimmten His-Tag zeigen, während sie für einen anderen His-Tag gering sein sollte. Um NTA-Gruppen mit definierten, unterschiedlichen Abständen zueinander zu erzeugen, sollten bivalenten Chelatorköpfe mit einem starren Molekülgerüst synthetisiert werden. Deren Wechselwirkung mit His-Tags verschiedener Flexibilität und Länge sollte abschließend charakterisiert werden. Durch die Verringerung der Flexibilität auf beiden Seiten des Systems sollte es möglich sein, orthogonale Bindungspaare zu generieren (**Schema 24**).



**Schema 24:** Schematische Darstellung des Einflusses der Flexibilität auf die Bindungseigenschaften zweier NTA/His-Tag-Bindungspaare. **(a)** Hohe Flexibilität auf beiden Seiten erlaubt uneingeschränkte Bindung. **(b)** Starre NTA-Moleküle mit flexiblen His-Tags schränken die Bindung nur einseitig ein. **(c)** Starre NTA-Moleküle und komplett starre His-Tags machen eine stabile Komplexbildung unwahrscheinlich. **(d)** Starre NTA-Moleküle und teilweise starre His-Tags ermöglichen eine differenzierte Bindung. grau: Histidine, grün: Ni<sup>2+</sup>-beladene NTA-Gruppen, schwarzer Pfeil: Bindung wahrscheinlich, grauer Pfeil: Bindung unwahrscheinlich/unmöglich.

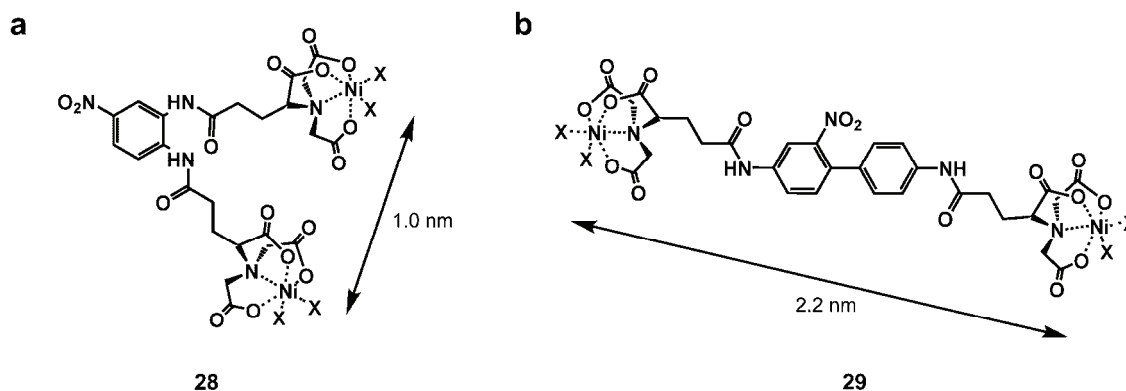
Ein kleiner Abstand zwischen den beiden beteiligten NTA-Gruppen sollte mit einem kurzen *His-Tag* eine hohe Affinität zeigen, während für einen großen Abstand zwischen den NTA-Gruppen ein entsprechend längerer *His-Tag* nötig sein sollte. Bei hoher Flexibilität auf beiden Seiten kann aber auch ein langer *His-Tag* an ein *bis*NTA mit kleinem intramolekularem Abstand binden und umgekehrt (**Schema 24 a**). Wird die Flexibilität auf Seiten der *bis*NTAs verringert, so kann der kurze *His-Tag* nicht mehr von dem NTA-Molekül mit großem Abstand zwischen den NTA-Gruppen komplexiert werden. Allerdings besteht weiterhin die Möglichkeit, dass das rigide *bis*NTA mit einem kleinen intramolekularem Abstand den langen, flexiblen *His-Tag* bindet (**Schema 24 b**). Werden komplett starre *His-Tags* mit rigiden *bis*NTAs verwendet, so ist eine Bindung eher unwahrscheinlich, weil für das Ausbilden einer stabilen Wechselwirkung eine zu hohe Passgenauigkeit von Nöten ist. Außerdem würde es durch atomare Schwingungen zu einer raschen Dissoziation des gebildeten Komplexes kommen (**Schema 24 c**). Für ein geeignetes System müssen also die verschiedenen *bis*NTAs möglichst starr sein und deutlich unterschiedliche Abstände zwischen den beiden NTA-Gruppen aufweisen. Die *His-Tags* hingegen sollten mit starren Abstandshaltern aufgeteilt werden, d.h. am Anfang und am Ende des *Tags* sollten sich kumulierte Histidine befinden, die für die Bindung an das jeweilige *bis*NTA zur Verfügung stehen. Dabei muss eine gewisse Flexibilität in den Histidinen erhalten bleiben. Der Abstandhalter zwischen den beiden *His*-Gruppen sollte in seiner Länge auf das jeweilige *bis*NTA abgestimmt sein (**Schema 24 d**).

## V.4.2 Ergebnisse und Diskussion

### V.4.2.1 Synthese der rigiden *bis*NTA-Chelatorköpfe

Um die Flexibilität der bivalenten NTAs so gering wie möglich zu halten, wurden aromatische Molekülgerüste verwendet, die mit jeweils zwei NTA-Gruppen modifiziert wurden. Zum einen wurde ein Nitrophenyldiamin (**26**), zum anderen ein 2-Nitrobenzidin (**27**) als Edukt verwendet. Auf diese Weise konnte für beide Moleküle, ausgehend vom jeweiligen Edukt, dieselbe Synthese durchgeführt werden. Die Nitrogruppen hatten den Vorteil, dass sie gegebenenfalls zu Aminen reduziert und weiter umgesetzt werden könnten. Die synthetisierten rigiden *bis*NTAs wurden vor den Bindungsstudien mit Ni<sup>2+</sup>-beladen. Eine Konzentrationsbestimmung der Ni<sup>2+</sup>-beladenen *bis*NTAs erfolgte über die charakteristische Absorption der aromatischen Einheiten.

In dem synthetisierten Nitrophenyl-*ortho-bis*NTA (**28**) hatten die beiden NTA-Gruppen einen Abstand von etwa 1.0 nm, während sie im Nitrobenzidin-*bis*NTA (**29**) etwa 2.2 nm voneinander entfernt waren (**Abb. 49**).



**Abb. 49:** Strukturformeln der rigiden *bis*NTAs. **(a)** Im Nitrophenyl-*ortho-bis*NTA (**28**) sind die NTA-Gruppen etwa 1.0 nm voneinander entfernt. **(b)** Im Nitrobenzidin-*bis*NTA (**29**) haben die NTA-Gruppen einen Abstand von etwa 2.2 nm. X = Wasser oder Histidin.

#### V.4.2.2 Verwendete His-Tags

Die in diesem Projekt verwendeten *His-Tags* waren mittels Peptidfestphasensynthese in Zusammenarbeit mit der Firma EMC microcollections hergestellt worden. Für Fluoreszenztitrationen waren die *Tags* *N*-Terminal mit einem Fluoreszein markiert. Die Sequenzen der untersuchten *His-Tags* sind in **Tabelle 22** wiedergegeben.

**Tabelle 22:** Verwendete Fluoreszein (Fl) markierte *His-Tags* mit Längenangaben.

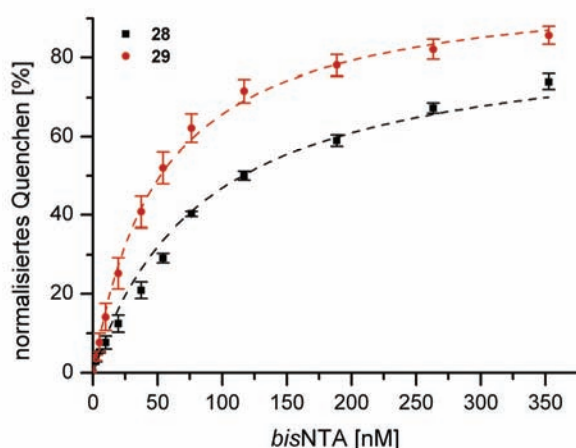
Nr.	Sequenz	ungefähre Länge [nm] bzw. ungefährer Abstand der His [nm]
<b>30</b>	Fl-HHHH	1.2
<b>31</b>	Fl-HHHHH	1.4
<b>32</b>	Fl-HHHPPPHHH	1.2
<b>33</b>	Fl-HHHPPPPPPPHHH	2.4
<b>34</b>	Fl-HAHPPPPHAH	1.2
<b>35</b>	Fl-HAHPPPPPPPHAH	2.4

Als Abstandhalter wurden Prolinsequenzen verwendet, von denen bekannt ist, dass sie relativ starre helikale Strukturen ausbildeten (siehe V.1). Auf diese Weise konnte der Abstand der Histidine den rigiden *bis*NTAs **28** und **29** angepasst werden. Außerdem wurden zwischen den Histidinen Alanine eingeführt, um die Flexibilität im Bereich der Histidine zu erhöhen (**Tabelle 22**).

Daraus ergab sich theoretisch, dass die *Tags* ohne (**30** und **31**) bzw. mit vier Prolinen (**32** und **34**) mit hoher Affinität an das Nitrophenyl-*ortho*-*bis*NTA (**28**) binden sollten, während der His<sub>5</sub>-*Tag* (**31**) und die *Tags* mit acht Prolinen (**33** und **35**) höhere Affinitäten für das Nitrobenzidin-*bis*NTA (**29**) aufzeigen sollten. Somit stellte der *Tag* **31** mit fünf kumulierten Histidinen den einzigen dar, der an beide *bis*NTAs mit etwa gleich hoher Affinität binden sollte.

#### V.4.2.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Affinitäten der *bis*NTAs **28** und **29** für die verschiedenen His-*Tags* wurden mittels Fluoreszenztitrationen bei 25°C bestimmt. Zu einer 20 nM Lösung aus Fluoreszein-markiertem His-*Tag* wurde das jeweilige *bis*NTA zutitriert. In **Abb. 50** ist exemplarisch die Titration des FI-HHHP<sub>4</sub>HHH-*Tags* (**32**) mit **28** (schwarz) und **29** (rot) gezeigt. Für die anderen His-*Tags* wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.



**Abb. 50:** Fluoreszenztitrationen von FI-H<sub>3</sub>P<sub>4</sub>H<sub>3</sub> (**32**) mit Nitrophenyl-*o*-*bis*NTA (**28**, schwarz) und Benzidin-*bis*NTA (**29**, rot).

Vor jedem Titrationsschritt wurde so lange gewartet, bis sich ein stabiles Fluoreszenzsignal eingestellt hatte. Die Fluoreszenzlöschung wurde gegen die *bis*NTA-Konzentration aufgetragen und durch eine LANGMUIR-Isotherme (**Gleichung 15**) gefittet. Die so ermittelten  $K_D$ -Werte sind in **Tabelle 23** für die einzelnen *bis*NTAs **28** und **29** und *Tags* **30-35** angegeben.

**Tabelle 23:**  $K_D$ -Werte für die rigiden *bis*NTAs **28** und **29** mit verschiedenen His-*Tags*. Die Werte wurden mittels Fluoreszenztitrationsen ermittelt.

Nr.	<i>Tag</i>	<b>28</b> $K_D$ [nM]	<b>29</b> $K_D$ [nM]
<b>30</b>	Fl-HHHH	$153 \pm 9.3$	$109 \pm 7.1$
<b>31</b>	Fl-HHHHH	$91 \pm 5.0$	$55 \pm 2.7$
<b>32</b>	Fl-HHHP <sub>4</sub> HHH	$124 \pm 8.0$	$52 \pm 2.9$
<b>33</b>	Fl-HHHP <sub>8</sub> HHH	$282 \pm 28.5$	$82 \pm 4.5$
<b>34</b>	Fl-HAHP <sub>4</sub> HAH	$282 \pm 22.0$	$102 \pm 4.9$
<b>35</b>	Fl-HAHP <sub>8</sub> HAH	$266 \pm 35.6$	$243 \pm 12.8$

Die durch Fluoreszenztitrationsen ermittelten  $K_D$ -Werte zeigten nicht den erhofften Unterschied in den Affinitäten und befanden sich alle in etwa derselben Größenordnung. Auch war nicht zu erkennen, dass die kurzen *Tags* bevorzugt vom Nitrophenyl-*ortho-bis*NTA (**28**) und die langen *Tags* vom Nitrobenzidin-*bis*NTA (**29**) gebunden wurden. Allerdings ließ sich aus den Ergebnissen auch keine neue Systematik ableiten. Es könnte sein, dass der Fluorophor mit dem rigiden *bis*NTA wechselwirkte und die Messergebnisse dadurch verfälscht wurden. Auf eine genauere Untersuchung dieses Phänomens oder die Charakterisierung mit anderen Methoden wurde verzichtet.

#### V.4.3 Schlussfolgerung

Mit den beiden synthetisierten *bis*NTAs, Nitrophenyl-*ortho-bis*NTA (**28**) und Nitrobenzidin-*bis*NTA (**29**), konnte die erhoffte orthogonale Markierung verschiedener His-*Tags* nicht umgesetzt werden. Möglich ist, dass der Unterschied im Abstand der beiden NTA-Gruppen zueinander noch zu gering war. Außerdem hatten die NTA-Gruppen aufgrund des relativ langen Linkers zum aromatischen System wahrscheinlich eine zu hohe Flexibilität. Diese Flexibilität erlaubte insbesondere bei **29** die Komplexierung aller His-*Tags* mit vergleichbarer Affinität. Zum Erreichen einer Orthogonalität müsste ein neues System ausgearbeitet werden.

#### V.4.4 Ausblick

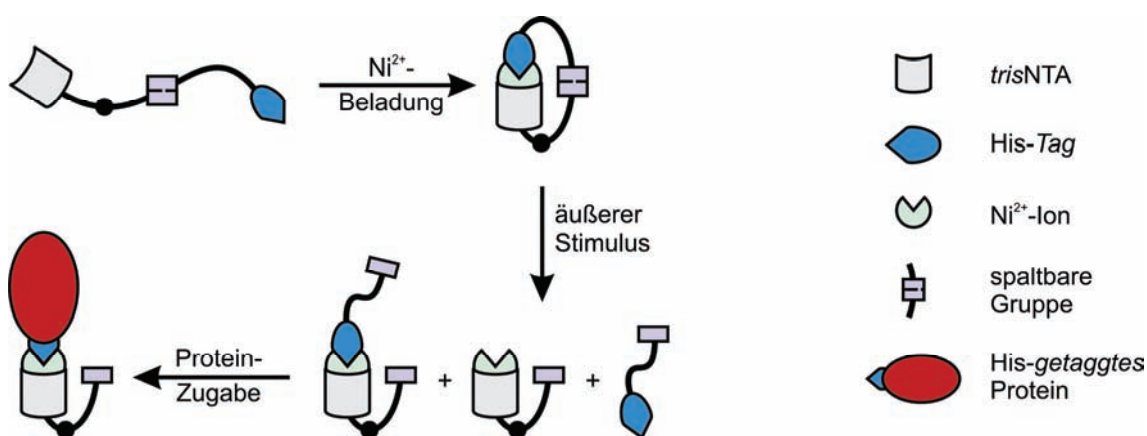
Um zu überprüfen, ob die mittels Fluoreszenztitration ermittelten  $K_D$ -Werte durch den Fluorophor beeinflusst wurden, müssten diese mit anderen Methoden bestimmt werden. Dies könnte z.B. mittels Titrationskalorimetrie (ITC) oder SPR-Spektroskopie erfolgen. Bei beiden Methoden kann auf die Markierung mit einem Fluorophor verzichtet werden, wodurch eine eventuelle Wechselwirkung ausgeschlossen werden könnte.

In einem neuen System, mit dem die orthogonale Bindung verschiedener *His-Tags* umgesetzt werden könnte, müsste die Flexibilität der rigiden *bis*NTAs weiter reduziert werden. Dazu müsste zunächst der Linker, der die NTA-Gruppen mit dem starren Molekülgerüst verbindet, verkürzt werden. Denkbar wäre außerdem, das starre aromatische System z.B. durch Polyproline als starre Abstandshalter zu ersetzen. Hierdurch wäre eine verbesserte Komplexierung der verwendeten *His-Tags* zu erwarten, weil diese zum Teil ebenfalls aus Polyprolinsequenzen aufgebaut waren. Durch die Verwendung von Polyprolinen auf beiden Seiten des Systems sollte es möglich sein, die für die Komplexbildung benötigte Passgenauigkeit beider Moleküle genügend zu erhöhen.

## V.5 Photoaktivierbare *tris*NTAs

### V.5.1 Hintergrund

Die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit Fluorophoren oder AFPs hat immer den Nachteil, dass die Modifikation nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert werden kann. Auch die von den Gruppen Piehler und Tampé entwickelten und in dieser Arbeit verwendeten MCHs wurden vielfach erfolgreich für die direkte Markierung von His-getaggten Proteinen eingesetzt<sup>94,98,204,233</sup>. In diesem Projekt sollte ein sich selbst inaktivierendes *tris*NTA synthetisiert werden, welches erst nach der Aktivierung durch einen äußeren Stimulus für die Bindung His-getaggtter Proteine zur Verfügung steht. Die Umsetzung sollte durch intramolekulare Histidine erfolgen, die das Ni<sup>2+</sup>-beladene *tris*NTA durch ihre Komplexierung für die Bindung eines intermolekularen His-Tags inaktivieren. Da die effektive Konzentration eines intramolekularen Liganden höher ist als die eines intermolekularen<sup>234-236</sup>, würde die intramolekulare Komplexbildung bevorzugt stattfinden. Zum Aktivieren des *tris*NTAs sollte der intramolekular gebildete Komplex durch einen äußeren Stimulus in einen intermolekularen Komplex gespalten werden. Dadurch könnte es entweder zu einer Komplexdissoziation, oder zu einer Verdrängung der Histidine durch einen anderen, möglicherweise längeren His-Tag kommen (**Schema 25**).



**Schema 25:** Schematische Darstellung der Idee für aktivierbare *tris*NTA-Verbindungen. Die reversible Komplexbildung mit kumulierten Histidinen wird nicht nur für die stabile Bindung eines Proteins genutzt, sondern auch um das *tris*NTA für eine solche zu deaktivieren. Die Aktivierung erfolgt durch eine Molekülsplattung und setzt aktives, Ni<sup>2+</sup>-beladenes *tris*NTA frei.



Das aktive, Ni<sup>2+</sup>-beladene *tris*NTA sollte nach der Spaltung in der Lage sein, spezifisch an ein His-*getagtes* Protein zu binden. Das Prinzip, welches das Schalten von einer sehr geringen zu einer extrem hohen (nanomolaren) Affinität verfolgt, sollte sowohl in Lösung als auch an Oberflächen zum Einsatz kommen.

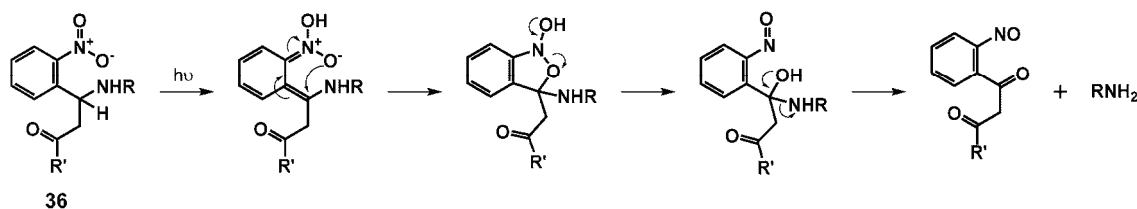
Als äußerer Stimulus für die Molekülspaltung wurde UV-Licht gewählt. Deshalb müssten die *tris*NTA-Gruppe und die intramolekularen, inaktivierenden Histidine durch eine photolabile Gruppe miteinander verbunden werden. Licht weist, weil es biokompatibel ist, einige Vorteile beim Einsatz in biologischen Systemen auf. Solange das Licht nicht zu kurzwellig ist, schädigt es keine Zellen. Außerdem reagieren die meisten Zellen nicht auf Licht, und die meisten Biomoleküle sind für Licht mit einer Wellenlänge  $\geq 350$  nm transparent. Die ausgelösten Photoreaktionen sind schnell, relativ unabhängig von äußeren Einflüssen und können unter milden, physiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Die Möglichkeit, Licht zu fokussieren, erlaubt außerdem die orts aufgelöste Auslösung der Photoreaktion in Lösung und auf Oberflächen. Bei Photoreaktionen mit biologischen Systemen ist darauf zu achten, dass (i) die photosensitive Spezies im jeweiligen Medium löslich ist, (ii) die Reaktion mit hoher Quantenausbeute verläuft, (iii) die entstehenden Nebenprodukte nicht toxisch sind oder mit dem Produkt interagieren, und (iv) die Photoreaktion schneller abläuft als die eventuell zu beobachteten Vorgänge.

Licht wurde in biologischen Systemen verwendet, um umstrukturierbare Peptide oder Proteine durch eine Konformationsänderung reversibel zwischen zwei Zuständen zu schalten<sup>19,237</sup>. Durch den Einbau einer photolabilen Gruppe in ein Peptid kann dessen Spaltung mit Licht induziert werden. Sind solche Peptide an ein Protein gebunden, so kann die Spaltung zur Freisetzung der Produkte führen. Dieses Prinzip wurde vielfach genutzt, um leere MHC-Moleküle<sup>238-241</sup> zu generieren, aber z.B. auch um einen Inhibitor der Tyrosin-Kinase gezielt aus dem Enzym zu entlassen<sup>242</sup> oder um den Zellzyklus in Hefen zu untersuchen<sup>243</sup>. Oftmals wurden biologisch aktive Substanzen durch das Anbringen einer photolabilen Schutzgruppe inaktiviert und durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge für eine spezifische Interaktion aktiviert. Solche Moleküle werden als „*caged molecules*“ bezeichnet. Inzwischen wurde eine Vielzahl verschiedenster irreversibel photoaktivierbarer Moleküle synthetisiert und erfolgreich zur Untersuchung biochemischer Prozesse eingesetzt<sup>237,244</sup>. Das wohl bekannteste Beispiel ist das *caged* Biotin, das erst nach Bestrahlung mit UV-Licht für die hochaffine Bindung mit einem (Strept)Avidin zur Verfügung steht<sup>144,245,246</sup>. Außerdem

wurde vor kurzem ein *caged*  $O^6$ -Benzylguanin für die getriggerte Markierung, Dimerisierung oder Immobilisierung SNAP-*getaggtter* Proteine synthetisiert<sup>247</sup>.

Im Zusammenhang mit biochemisch relevanten Oberflächen wurde Licht vielfach verwendet, um Proteine oder deren Liganden mit hoher Auflösung zu strukturieren. Photolabile Schutzgruppen wurden benutzt um z.B. Peptide<sup>248,249</sup>, Oligocarbamate<sup>250</sup> oder Peptide<sup>251</sup> direkt auf Oberflächen zu synthetisieren. Die durch die Abspaltung photolabiler Schutzgruppen freigesetzten Funktionalitäten wurden außerdem für weitere Modifikationen der Oberfläche<sup>187,252,253</sup> oder die direkte Proteinimmobilisierung<sup>144,245</sup> genutzt. Spaltungsreaktionen mit photolabilen Gruppen wurden zur Abspaltung von Peptiden nach der Festphasensynthese<sup>254-258</sup> und zur orts aufgelösten Abspaltung funktionaler Moleküle<sup>259</sup> oder Proteine<sup>260</sup> von Oberflächen eingesetzt. Eine andere Strategie ist die Photoimmobilisierung, bei der die Bindung von Proteinen<sup>143,261-263</sup> oder kleinen Molekülen<sup>147,264</sup>, die im Nachhinein mit einem Protein interagieren, an die Oberfläche durch eine photoinduzierte Reaktion stattfindet.

Die 2-Nitrobenzylgruppe und deren Derivate sind die wohl am häufigsten eingesetzten photolabilen Gruppen in der Chemie und Biochemie. Auch in dieser Arbeit sollte ein 2-Nitrobenzylderivat, nämlich die 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)propionsäure (*Anp*, **36**), für die photoinduzierte Abspaltung der intramolekularen Histidine von der *tris*NTA-Gruppe genutzt werden. Es wird postuliert, dass diese Verbindungen durch die Bestrahlung mit UV-Licht über ein diradikalisches Anionen in die entsprechenden metastabilen *aci*-Nitroverbindungen überführt werden. Diese zerfallen über ein zyklisches Zwischenprodukt in die jeweiligen Produkte<sup>244,265,266</sup>. Bei **36** entstehen so ein Nitrosophenyl- $\alpha$ -Keton und ein primäres Amin (**Abb. 51**).

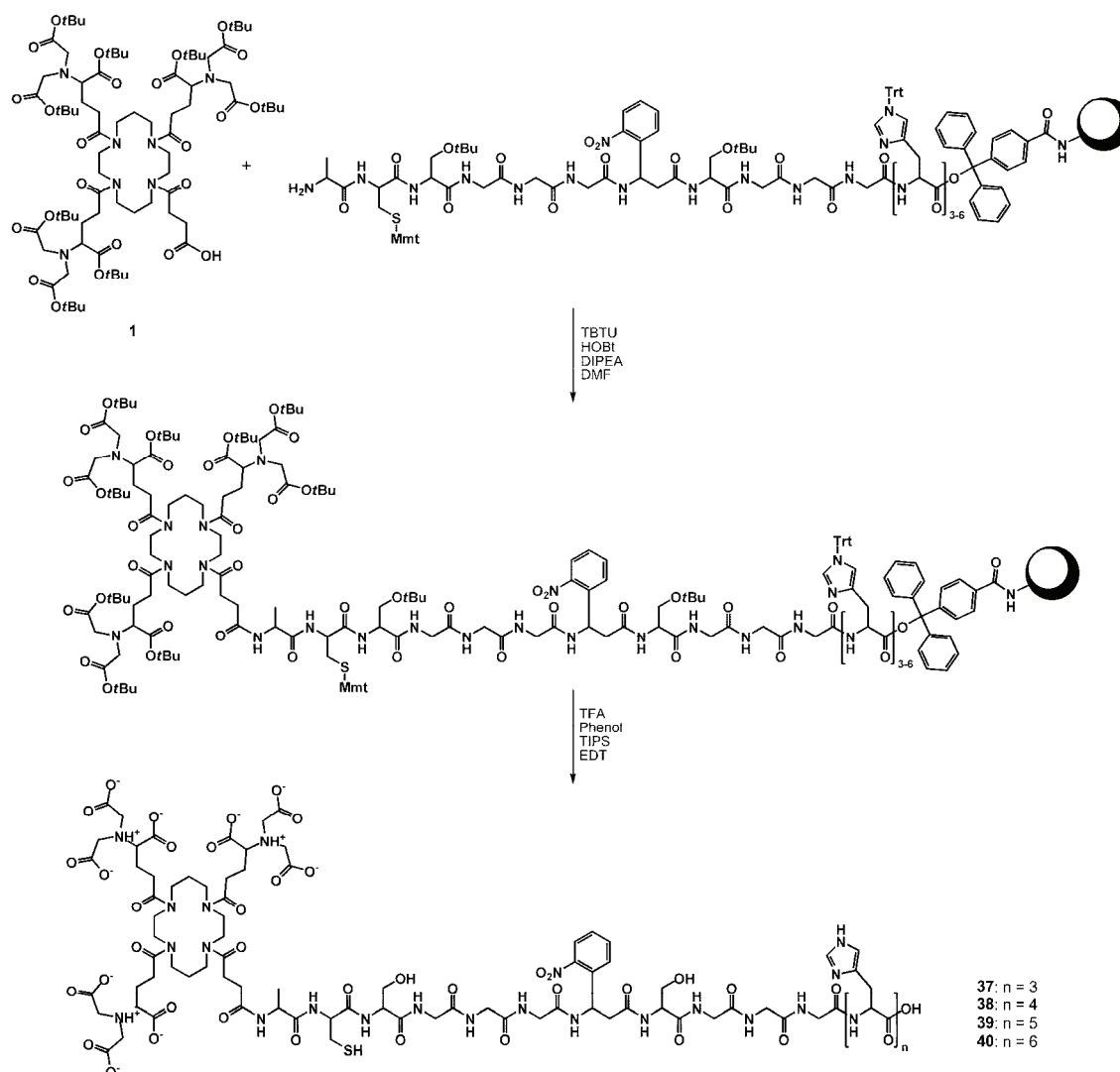


**Abb. 51:** Postulierter Spaltungsmechanismus für die Photolyse von substituierter 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)propionsäure (*Anp*, **36**).

## V.5.2 Ergebnisse und Diskussion

### V.5.2.1 Design und Synthese der *PATris*NTAs

Die Synthese der photoaktivierbaren *tris*NTAs (*PATris*NTAs) erfolgte unter Verwendung von Peptiden. Diese Peptide waren aus einer *tris*NTA-Gruppe am *N*-Terminus und drei bis sechs Histidinen am *C*-Terminus aufgebaut. Die unterschiedliche Anzahl an intramolekularen Histidinen sollte zu einer verschieden starken Selbstinaktivierung des *tris*NTAs führen.



**Abb. 52:** Synthese der photoaktivierbaren *tris*NTAs **37-40** (*PATris*NTAs). Zunächst erfolgte die Kupplung von Carboxy-*tris*NTA(OtBu) (**1**) an die auf dem Harz gebundenen photolabilen His-Peptide. Anschließend wurde das Peptid mit TFA vom Harz abgespalten und gleichzeitig entschützt. In dem gezeigten Fall ist die Seitenkette des Cysteins mit einer säurelabilen Mmt-Gruppe geschützt.

Beide Termini wurden durch einen flexiblen Serin-Glycin-Linker miteinander verbunden, in welchen das photolabile *Anp* (**36**) integriert war. Der Linker war so konzipiert, dass eine intramolekulare Komplexbildung stattfinden konnte. Des Weiteren befand sich in der Nähe des *tris*NTAs ein Cystein, durch das eine spezifische chemische Modifikation der Peptide, z.B. mit einem Fluorophor, ermöglicht wurde. Es ergaben sich die folgenden Peptide: *tris*NTA-ACSGGG*Anp*SGGGH<sub>n</sub> (*tris*-C*Anp*H<sub>n</sub>) mit n = 3-6 (**Abb. 52**).

Für die manuelle Kupplung des Carboxy-*tris*NTA(*Ot*Bu)<sub>s</sub> (**1**) an den freien *N*-Terminus der Peptide, wurden diese auf dem Harz belassen (**Abb. 52**). Aufgrund des hohen sterischen Anspruchs der *tris*NTA-Verbindung und der scheinbar schlechten Zugänglichkeit der Peptide auf dem Harz musste der Syntheseschritt mehrfach wiederholt werden. Trotzdem konnten nach der Reinigung mittels RP-HPLC nur Ausbeuten um die 18% erhalten werden. Zu Beginn des Projektes wurden Cysteine mit einer säurestabilen *S*tBu-Schutzgruppe verwendet, um eine Reaktion der abgespaltenen *t*Bu-Schutzgruppen mit der Thiofunktion des Cysteins während der Entschützung zu verhindern. Diese Peptide mussten nach der ersten Reinigung reduziert und nochmals chromatographisch gereinigt werden, was die Ausbeuten weiter verringerte. Durch das Verwenden einer säurelabilen Mmt-Schutzgruppe für das Cystein und EDT während der Entschützung konnte auf den zweiten Syntheseschritt verzichtet werden.

**Tabelle 24:** Berechnete und bestimmte Molmassen der P*A**tris*NTAs.

Nr.	Peptid	Summenformel	MW <sub>ber.</sub>	ESI-MS [ <i>m/z</i> ]
<b>37</b>	<i>tris</i> -C <i>Anp</i> H <sub>3</sub>	C <sub>92</sub> H <sub>128</sub> N <sub>28</sub> O <sub>42</sub> S	2330.23	2331.05, 2393.00 [100%], 2455.06, 2516.92
<b>38</b>	<i>tris</i> -C <i>Anp</i> H <sub>4</sub>	C <sub>98</sub> H <sub>135</sub> N <sub>31</sub> O <sub>43</sub> S	2467.37	2468.00 [100%], 2531.57, 2592.86
<b>39</b>	<i>tris</i> -C <i>Anp</i> H <sub>5</sub>	C <sub>104</sub> H <sub>142</sub> N <sub>34</sub> O <sub>44</sub> S	2604.51	2605.16 [100%], 2668.08, 2703.13, 2731.86
<b>40</b>	<i>tris</i> -C <i>Anp</i> H <sub>6</sub>	C <sub>110</sub> H <sub>149</sub> N <sub>37</sub> O <sub>45</sub> S	2741.65	2742.67 [100%], 2764.67, 2786.14, 2807.43, 2829.36

Die Verwendung der konventionellen Peptidfestphasensynthese für die Darstellung der P*A**tris*NTAs hat den großen Vorteil, dass die Eigenschaften der Verbindungen

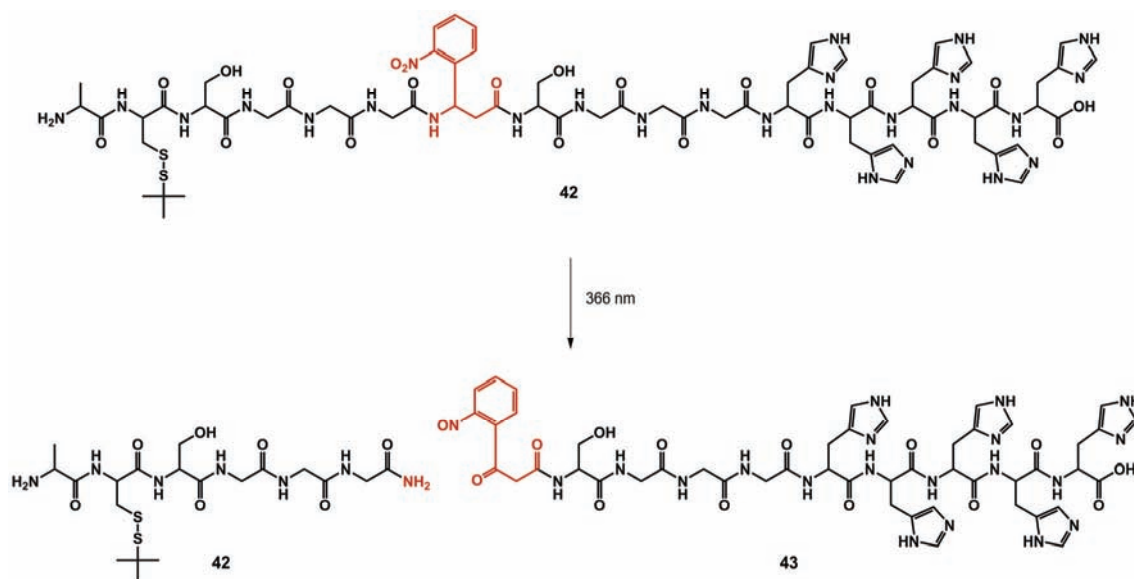
schnell und einfach verändert werden können. So kann z.B. die Aminosäuresequenz, die Länge und Zusammensetzung des flexiblen Linkers oder die Position des *Anps* (**36**) leicht variiert werden. Dadurch können die Verbindungen einem speziellen Problem ohne die Entwicklung einer komplett neuen Synthesestrategie schnell angepasst werden.

Im nächsten Schritt wurde die Charakterisierung der erfolgreich dargestellten *PAtris*NTAs in Lösung durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Spaltung von **36** genauer untersucht.

### V.5.2.2 Photoinduzierte Spaltung in Lösung

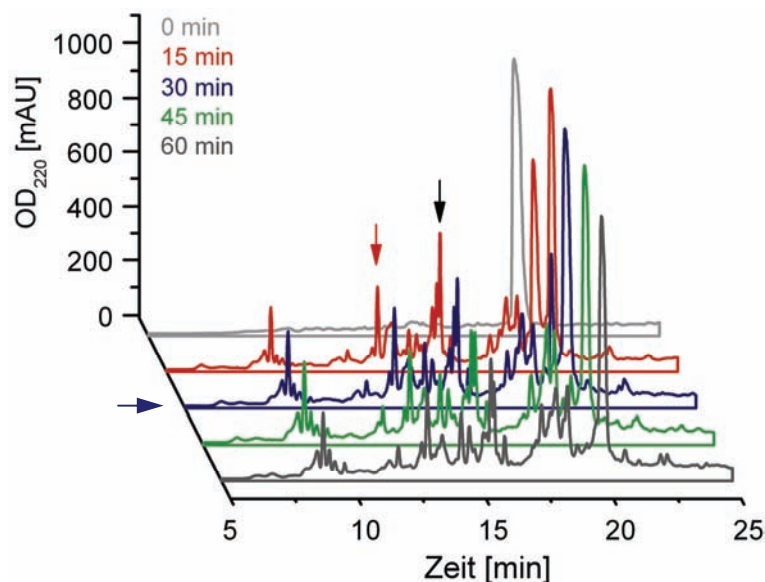
#### V.5.2.2.1 Reaktionskontrolle mittels RP-HPLC

Das Peptid AC(*St*Bu)SGGG*Anp*SGGGHHHHH (**41**) wurde verwendet, um die photoinduzierte Spaltung des *Anps* (**36**) in Lösung zu charakterisieren. Dabei entstanden als Spaltfragmente ein Cystein-haltiges Peptid (**42**) und ein His<sub>5</sub>-Peptid (**43**; **Abb. 53**).



**Abb. 53:** Lichtinduzierte Spaltung von AC(*St*Bu)SGGG*Anp*SGGGHHHHH (**41**). Es entstehen zwei Fragmente: ein Cys-haltiges Peptid **42** (537.65 g/mol) und ein His<sub>5</sub>-Peptid **43** (1137.08 g/mol).

Der Verlauf der Photospaltung nach verschiedenen Belichtungszeiten wurde mittels RP-HPLC verfolgt, und die erhaltenen Peaks wurden massenspektroskopisch untersucht (**Abb. 54**).

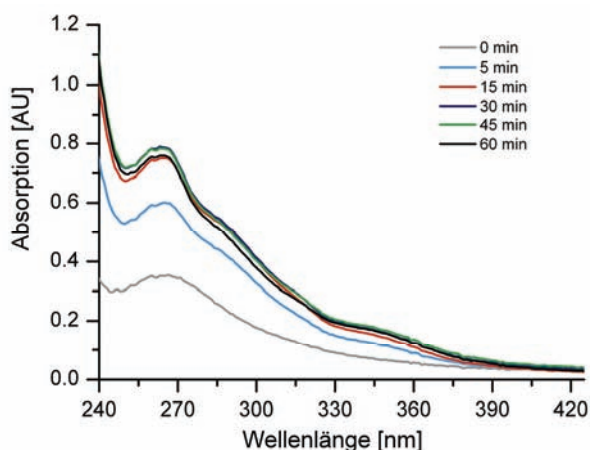


**Abb. 54:** RP-HPLC Chromatogramme der photoinduzierten Spaltung von AC(SiBu)SGGGAnpSGGGHH HHH (41). Die Lösungen wurden unterschiedlich lange belichtet (366 nm), und die Detektion erfolgte bei 220 nm. Die Pfeile markieren die beiden entstandenen Fragmente 42 (schwarz) und 43 (rot) sowie die 30 minütige Belichtungszeit (blau).

Es zeigte sich, dass bereits nach einer Belichtungszeit von 15 min (**Abb. 54**; rot) mehr als die zwei zu erwarteten Peaks entstanden waren. Von diesen Peaks konnten zwei den beiden erwarteten Fragmenten 42 (**Abb. 54**; schwarzer Pfeil) und 43 (roter Pfeil) massenspektroskopisch zugeordnet werden. Ab einer Belichtungszeit von 30 min (**Abb. 54**; dunkelblau) war keine weitere Veränderung der Produktpeaks mehr detektierbar. Es wurde daher unter den verwendeten Bedingungen von einer Belichtungszeit von 30 min ausgegangen.

#### V.5.2.2.2 Reaktionskontrolle mittels UV/Vis-Spektroskopie

Neben der Reaktionskontrolle mittels RP-HPLC wurde die Photolyse durch die Aufnahme von UV/Vis-Spektren untersucht. Von unbelichtetem und verschieden lang belichtetem *tris*NTA-ACSGGGAnpSGGGHHHH (38) wurden Spektren im Bereich von 240 bis 425 nm aufgenommen (**Abb. 55**).



**Abb. 55:** UV/Vis-Spektren von *tris*NTA-ACSGGGAnpSGGGHHH (**38**). Die Spektren wurden vor (graue Kurve) und zu verschiedenen Zeitpunkten der Belichtung aufgenommen.

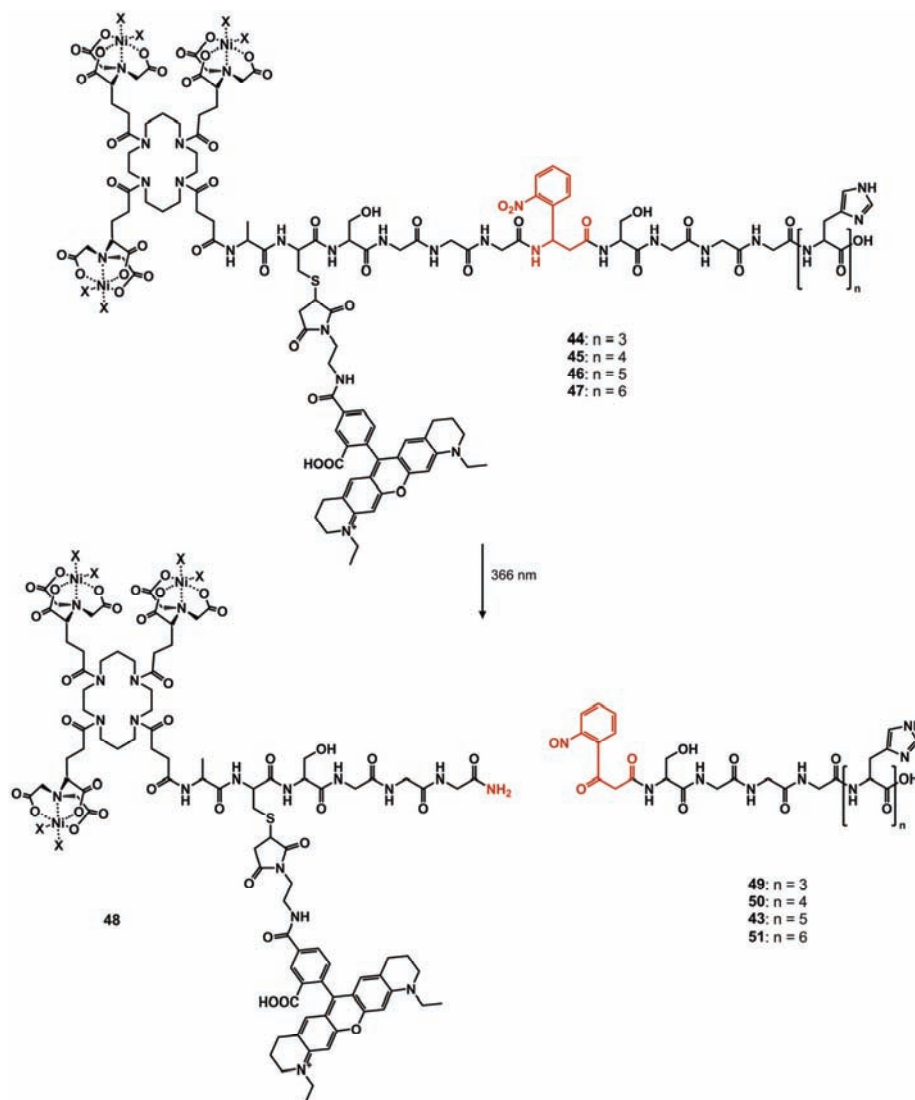
Das Spektrum von unbelichtetem **38** (**Abb. 55**; grau) zeigte ein Maximum bei ca. 268 nm, welches der 2-Nitrobenzylgruppe zuzuschreiben war. Durch die Belichtung verschob sich das Maximum zu geringfügig kürzeren Wellenlängen und die Absorption nahm zunächst bis zu einer Belichtungszeit von 30 min (**Abb. 55**; dunkelblau) zu. Neben der Absorptionzunahme im Bereich von 265 nm entstanden außerdem wenig ausgeprägte Schultern in den Bereichen um 285, 316 und 348 nm. Die Spektren nach 30 min (**Abb. 55**; dunkelblau) und 45 min (grün) Belichtung unterschieden sich nicht, während nach einer Belichtungszeit von 60 min (schwarz) eine Reduktion des Peakmaximums bei 265 nm und in den Schultern zu beobachten war.

### V.5.2.3 Fluoreszenzmarkierung der *P**At**ris*NTAs

Um eine orthogonale Dektection der *P**At**ris*NTAs im UV/Vis-Bereich und damit die Visualisierung der Bindung an His-*getaggte* Proteine in Lösung zu ermöglichen, wurden die *P**At**ris*NTAs **37-40** erfolgreich mit einem ATTO565-Maleimid-Farbstoff markiert (**Tabelle 25**). Nach Reinigung der markierten *P**At**ris*NTAs **44-47** mittels RP-HPLC wurden die NTA-Gruppen durch die Zugabe eines Überschusses an Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladen. Überschüssiges Ni<sup>2+</sup> wurde mittels Anionenaustauschchromatographie entfernt. Dabei wurde ein Waschschriff mit EDTA durchgeführt, um Ni<sup>2+</sup>-Ionen, welche an den Histidinen gebunden waren, zu entfernen. Durch die Photoaktivierung dieser Verbindungen wurde ein aktives, Ni<sup>2+</sup>-beladenes, ATTO565-markiertes *tris*NTA (**48**) für die spezifische Bindung an His-*getaggte* Proteine freigesetzt (**Abb. 56**).

**Tabelle 25:** Berechnete und bestimmte Molmassen der ATTO565-markierten PA*tris*NTAs **34-37**.

Nr.	Peptid	Summenformel	MW <sub>ber.</sub>	ESI-MS [ <i>m/z</i> ]
<b>44</b>	<i>tris</i> -C(ATTO) <i>Anp</i> H <sub>3</sub>	C <sub>129</sub> H <sub>165</sub> N <sub>32</sub> O <sub>48</sub> S <sup>+</sup>	2963.94	2965.11, 3027.52 [100%], 3093.71
<b>45</b>	<i>tris</i> -C(ATTO) <i>Anp</i> H <sub>4</sub>	C <sub>135</sub> H <sub>172</sub> N <sub>35</sub> O <sub>49</sub> S <sup>+</sup>	3101.08	3100.60, 3163.75, 3226.60, 3289.74 [100%]
<b>46</b>	<i>tris</i> -C(ATTO) <i>Anp</i> H <sub>5</sub>	C <sub>141</sub> H <sub>179</sub> N <sub>38</sub> O <sub>50</sub> S <sup>+</sup>	3238.22	3364.88, 3428.21 [100%]
<b>47</b>	<i>tris</i> -C(ATTO) <i>Anp</i> H <sub>6</sub>	C <sub>147</sub> H <sub>186</sub> N <sub>41</sub> O <sub>51</sub> S <sup>+</sup>	3375.36	3374.63, 3437.30 [100%], 3457.16

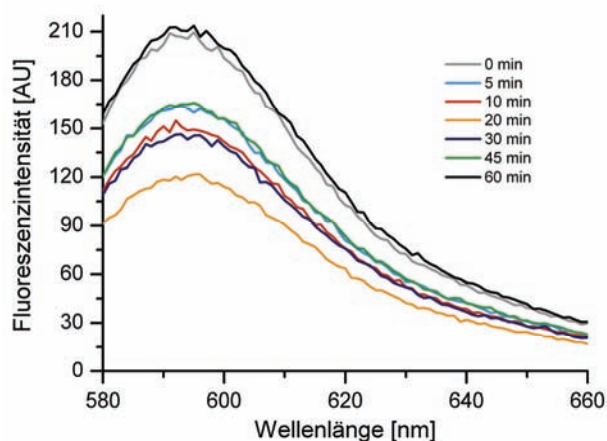
**Abb. 56:** Photoaktivierung der ATTO565-markierten PA*tris*NTAs (**44-47**). Durch die Spaltung werden ein fluoreszenzmarkiertes, Ni<sup>2+</sup>-beladenes, aktives *tris*NTA (**48**) und ein His-Peptid (**43, 49-51**) generiert.



Die fluoreszenzmarkierten *PAt*risNTAs **44-47** konnten erfolgreich dargestellt werden. Im Folgenden sollten die Verbindungen in Lösung näher charakterisiert werden.

#### V.5.2.3.1 Fluoreszenzintensitäten

Der Einfluss der Photoaktivierung auf die Fluoreszenzintensität von *tris*-C(ATTO565)*Anp*H<sub>3</sub> (**34**) wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dafür wurden zu verschiedenen Belichtungszeiten Emissionsspektren im Bereich von 580 bis 660 nm aufgenommen (**Abb. 57**).



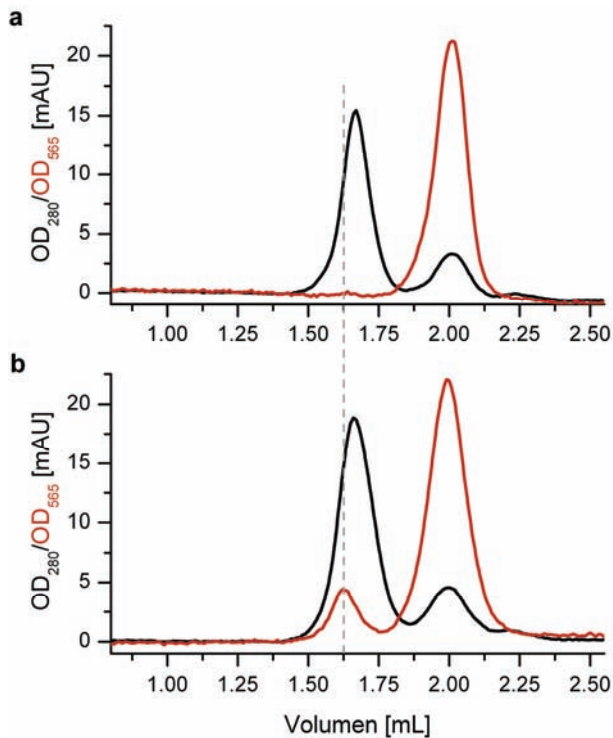
**Abb. 57:** Zu verschiedenen Belichtungszeiten aufgenommene Emissionsspektren von *tris*-C(ATTO565)*Anp*H<sub>3</sub> (**44**). Die Anregung des Fluorophors erfolgte bei 565 nm.

Die Fluoreszenzintensität nahm zunächst ab und stieg nach einer Belichtungszeit von 20 min wieder an. Nach 60 min wurde die Ausgangsintensität wieder erlangt. Unter den verwendeten Bedingungen fand also kein Bleichen des Fluorophors statt.

#### V.5.2.4 Stabile Komplexbildung mit MBP-H<sub>6</sub>

Um die Bindungseigenschaften der inaktivierten und aktivierten *PAt*risNTAs **44-47** in Lösung zu charakterisieren, wurde die stabile Komplexbildung mit MBP-H<sub>6</sub> untersucht. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Belichtungs- und Inkubationszeiten mit *tris*-C(ATTO565)*Anp*H<sub>5</sub> (**46**) getestet. MBP-H<sub>6</sub> und **46** wurden dazu im äquimolaren Verhältnis miteinander gemischt, unterschiedlich lange belichtet und unter Lichtausschluss inkubiert. Die inaktivierten und aktivierten Proben wurden anschließend mittels Gelfiltration auf eine stabile Komplexbildung hin analysiert. Bei der unbelichteten Probe eluierte freies MBP-H<sub>6</sub> bei einem Volumen von 1.66 mL und

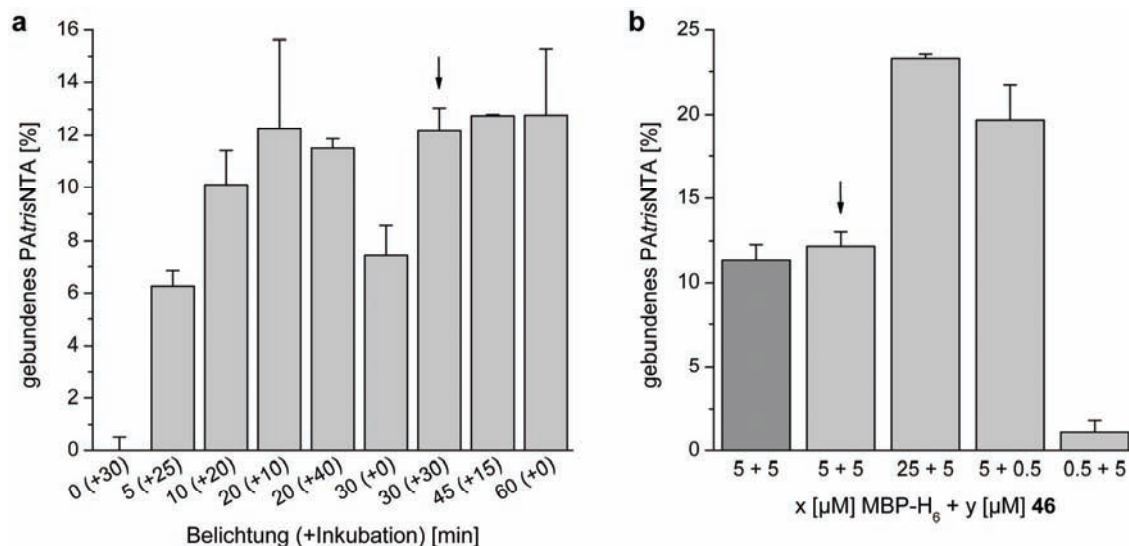
zeigte keine Absorption bei 565 nm. Inaktiviertes **46** eluierte bei  $V = 2.00$  mL und wies neben einer schwachen Absorption bei 280 nm die charakteristische Absorption bei 565 nm auf (**Abb. 58 a**).



**Abb. 58:** Stabile Komplexbildung zwischen *tris*-C(ATTO565)*Anp*H<sub>5</sub> (**46**) und MBP-H<sub>6</sub> analysiert mittels Gelfiltration. Chromatogramme einer äquimolaren Mischung vor (**a**) und nach (**b**) der Photoaktivierung mit UV-Licht für 30 min. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz) und 565 nm (rot) detektiert.

Eine stabiler Komplex zwischen dem MBP-H<sub>6</sub> und **46** nach der Photoaktivierung (**Abb. 58 b**) wurde durch zwei Beobachtungen demonstriert: (i) eine Absorption bei 565 nm im MBP-Elutionspeak, und (ii) eine Verschiebung des Elutionspeaks zu kleinerem Volumen ( $V = 1.62$  mL) aufgrund der Größenzunahme des markierten MBPs. In Gegenwart von Imidazol oder EDTA fand keine stabile Bindung statt, was die Spezifität der Komplexbildung über das *tris*NTA bewies.

Nach der Photoaktivierung von **46** wurden in dem Elutionspeak vom MBP-H<sub>6</sub> für die zwei Wellenlängen zwei gegeneinander verschobene Maxima gefunden. Diese Beobachtung bedeutete, dass nicht die gesamte Menge an eingesetztem MBP-H<sub>6</sub> markiert worden war. Der Anteil an gebundenem **46** wurde über die Peakflächen der 565 nm Absorption bestimmt. Die Gesamtfläche unterhalb der Kurve wurde auf 100% gesetzt und der prozentuale Anteil des Peaks, der mit dem MBP-H<sub>6</sub> eluierte, bestimmt. Die Menge an gebundenem, aktivierten *tris*NTA **48** hing dabei eindeutig von der Belichtungs- und anschließenden Inkubationszeit ab (**Abb. 59 a**).



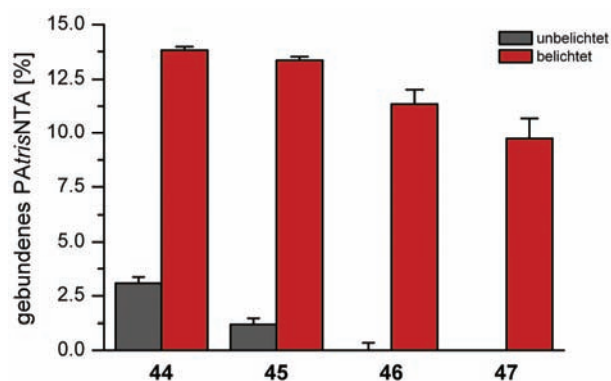
**Abb. 59:** Prozentualer Anteil von MBP-H<sub>6</sub> gebundenem, ATTO565-markiertem *tris*NTA **48**. **(a)** Abhängigkeit von den Belichtungs- und Inkubationszeiten. MBP-H<sub>6</sub> und *tris*-C(ATTO565)*Anp*H<sub>5</sub> (**46**) wurden in äquimolaren Mengen (5 μM) gemischt und wie angegeben behandelt. **(b)** Abhängigkeit von eingesetzten Konzentrationen und Verhältnissen. MBP-H<sub>6</sub> und **46** wurden in den angegebenen Verhältnissen miteinander gemischt und für jeweils 30 min belichtet und unter Lichtausschluss inkubiert (hellgraue Balken). Außerdem wurde **46** separat 30 min aktiviert und anschließend für 30 min mit MBP-H<sub>6</sub> inkubiert (dunkelgrauer Balken). Schwarze Pfeile: gewählte Standardbedingungen für die folgenden Studien.

Bei einem äquimolaren Verhältnis von *tris*-C(ATTO565)*Anp*H<sub>5</sub> (**46**) zu MBP-H<sub>6</sub> wurde der maximale Anteil an aktiviertem, gebundenem *tris*NTA **48** nach einer Belichtungszeit von 30 min auf Eis und einer anschließenden Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur erreicht (**Abb. 59**; Pfeile). Hier waren etwa 12% des *tris*NTAs **48** an das MBP-H<sub>6</sub> gebunden. Da eine weitere Verlängerung der Belichtungszeit nicht zu nennenswert mehr markiertem MBP-H<sub>6</sub> führte, wurden diese Bedingungen für die weiteren Analysen verwendet. Auch die Belichtung von **46** ohne Protein und die anschließende Inkubation mit MBP-H<sub>6</sub> für 30 min führte zu einem vergleichbaren Wert für den Anteil an gebundenem **48** (**Abb. 59 b**; dunkelgrauer Balken).

In der folgenden Studie wurde der Einfluss verschiedener molarer Verhältnisse auf die Menge an gebundenem **48** mittels Gelfiltration untersucht (**Abb. 59 b**; hellgraue Balken). Der Einsatz eines 5 bis 10-fachen Überschusses an MBP-H<sub>6</sub> führte zwar zu einer Erhöhung des Anteils an gebundenem PATrisNTA **46**, allerdings lagen immer mehr als 75% ungebunden vor. Um zu untersuchen, ob eine Markierung aller angebotenen His<sub>6</sub>-getaggt MBPs erreicht werden konnte, wurden die Verhältnisse

umgekehrt. Allerdings führte auch ein 10-facher Überschuss an **46** nicht zu einer Markierung aller angebotenen MBPs.

Für den direkten Vergleich der vier *PA**tris*NTAs **44-47** wurden die folgenden Standardbedingungen verwendet: (i) belichtet wurde eine jeweils äquimolare Mischung (5  $\mu$ M) von MBP- $H_6$  und *PA**tris*NTA, (ii) belichtet wurde für 30 min auf Eis, (iii) inkubiert wurde für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss (**Abb. 60**).



**Abb. 60:** Anteil an MBP- $H_6$  gebundenem *PA**tris*NTA **44-47** vor (graue Balken) und nach (rote Balken) der Photoaktivierung in Abhängigkeit von der Anzahl der intramolekularen Histidine.

Der Grad der Inaktivierung des *tris*NTA hing eindeutig mit der Anzahl der intramolekularen Histidine im *PA**tris*NTA zusammen. Bei nur drei oder vier inaktivierenden Histidinen wurde auch ohne Photoaktivierung eine Komplexbildung von MBP- $H_6$  beobachtet (**Abb. 60**; graue Balken). Ab einer Länge von fünf Histidinen konnte keine stabile Komplexbildung mehr detektiert werden. Daraus ließ sich schließen, dass mindestens fünf Histidine benötigt wurden, um einen stabilen intramolekularen *tris*NTA/Histidin-Komplex zu bilden, der zu einer effektiven Selbstinaktivierung des *tris*NTAs führte.

Nach der Photoaktivierung nahm der Anteil an gebundenem, ATTO565-markiertem *PA**tris*NTA für alle vier Konstrukte deutlich zu (**Abb. 60**; rote Balken). Es zeigte sich, dass auch hier der Anteil abhängig von der Anzahl der Histidine im *PA**tris*NTA war und mit abnehmender Anzahl anstieg. Wurde das *PA**tris*NTA mit fünf (**46**) oder sechs (**47**) Histidinen benutzt, die eine komplette Selbstinaktivierung vor der Photoaktivierung zeigten, so wurden unter den gewählten Bedingungen maximal etwa 12% des angebotenen MBPs markiert.

Die Tatsache, dass es unter den getesteten Bedingungen nicht möglich war eine 100%ige Markierung des MBPs zu erreichen, ließ sich wie folgt erklären: Zum einen wurde mit jeder Photospaltung ein freies His-Peptid (**43**, **49-51**) generiert, welches mit

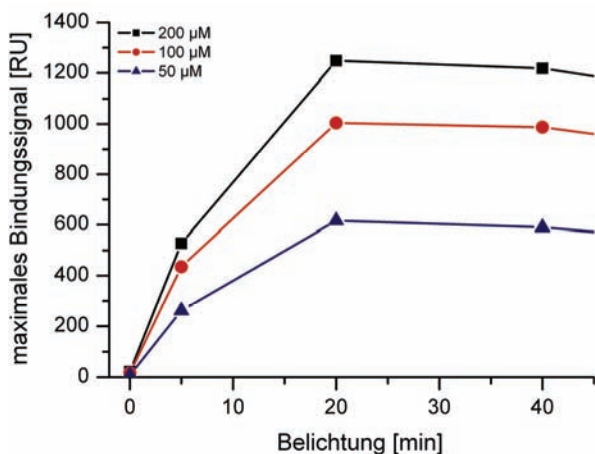
dem *His-Tag* des MBPs um die Bindung an das *tris*NTA konkurrierte. Zum anderen konnte der intramolekulare Komplex auch nach der Aktivierung eine so hohe Stabilität aufweisen, dass er die Komplexierung eines anderen *His-Tags* weiterhin verhinderte. Beide Effekte nehmen mit abnehmender Anzahl an intramolekularen Histidinen ab, wodurch die steigenden Markierungsgrade erklärt werden konnten. Trotzdem stellen die 12% Markierung gerade in biochemischen Anwendungen einen ausreichend hohen Anteil dar. Die vollständige Selbstinaktivierung des *tris*NTAs vor der Photoaktivierung ist wichtiger als die komplette Markierung des angebotenen Proteins nach der Belichtung.

Die Gelfiltration demonstrierte, dass die Spaltung des *PAtris*NTAs und die damit verbundene Aktivierung der *tris*NTA-Gruppe in Lösung funktionierte, und eine stabile und spezifische Komplexierung eines *His-getaggten* Proteins stattfand. Im nächsten Schritt sollte die Charakterisierung der Verbindungen an Grenzflächen erfolgen. Diese Studien erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. C. GRUNWALD.

### V.5.2.5 Photoinduzierte Aktivierung an Oberflächen

#### V.5.2.5.1 Stabile Immobilisierung *His-getaggtter* Proteine

Die Verwendung der *PAtris*NTAs **37-40** für die Herstellung von photoaktivierbaren Oberflächen, die Proteine reversibel binden können, wurde zunächst mittels SPR-Spektroskopie untersucht. In Vorversuchen wurden die für die Kupplung und Belichtung benötigten Bedingungen mit dem *tris*-*CAnpH*<sub>5</sub> (**39**) getestet. Dazu wurde **39** in drei verschiedenen Konzentrationen (50-200  $\mu$ M) über das Cystein an die Dextranmatrix eines Sensorchips gekuppelt. Durch eine Beladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen wurden die *tris*NTA-Gruppen inaktiviert. Die Bindung von MBP-H<sub>6</sub> auf diesen Oberflächen wurde in Echtzeit verfolgt. Anschließend wurde der Chip mehrmals für verschiedene Zeiträume mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt, und die Bindungsstudien mit MBP-H<sub>6</sub> wurden nach jeder Belichtung wiederholt. Die Oberflächen zeigten ohne Belichtung eine vernachlässigbare Proteinbindung (**Abb. 61**).



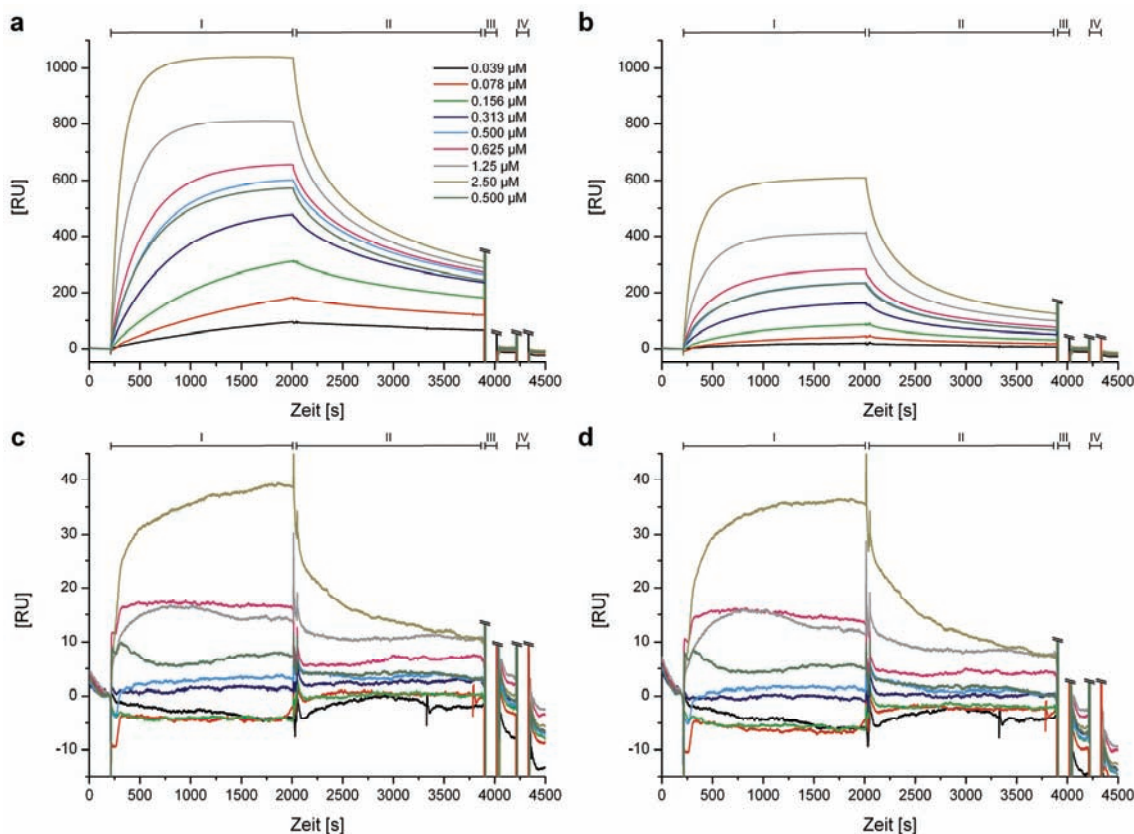
**Abb. 61:** Maximale Bindungssignale ( $RU_{\max}$ ) aus SPR-Experimenten mit  $1.25 \mu\text{M}$  MBP- $H_6$  auf  $\text{Ni}^{2+}$ -beladenen *tris*-CAnpH $_5$  (**39**)-Oberflächen. **39** wurde in drei verschiedenen Konzentrationen ( $50$ - $200 \mu\text{M}$ ) auf die Goldoberfläche gekuppelt. Das MBP- $H_6$  wurde für  $30$  min injiziert und die maximalen Bindungssignale gegen die Belichtungszeit aufgetragen. Die Messungen wurden von Dr. C. GRUNWALD durchgeführt.

Bei einer Belichtungszeit von etwa  $30$  min wurde ein maximales Bindungssignal erhalten. Außerdem nahm, wie zu erwarten war, mit zunehmender Konzentration von *tris*-CAnpH $_5$  (**39**) an der Oberfläche auch das Bindungssignal zu. Diese Vorexperimente ergaben, dass eine Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  P*Attris*NTA zur Oberflächenkupplung gut auswertbare Bindungssignale für MBP lieferte.

Um einen direkten Vergleich der vier P*Attris*NTAs **37-40** durchführen zu können, wurde je eine Verbindung in je einem Kanal der Flusszelle des SPR-Spektrometers gekuppelt. Die Bindungsstudien wurden mit MBP- $H_6$  und MBP- $H_{10}$  in aufsteigenden Konzentrationen ( $39$  nM bis  $2.5 \mu\text{M}$ ) auf den inaktivierten und den aktivierten Oberflächen durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der Proteinbindung zu testen, wurde eine Doppelinjektion der  $0.5 \mu\text{M}$  Proben durchgeführt. Diese wurden als letzte Probe der Konzentrationsreihen ein zweites Mal injiziert. Die Reversibilität der Proteinimmobilisierung mit Imidazol und EDTA wurde zum einen ausgenutzt, um die Oberflächen vor der folgenden Injektion zu regenerieren. Zum anderen demonstrierte sie die Spezifität der Bindung über die *tris*NTA/His-Tag-Wechselwirkung. Diese wurde außerdem dadurch bestätigt, dass ohne  $\text{Ni}^{2+}$ -Beladung keine Proteinbindung detektierbar war. Die ohne  $\text{Ni}^{2+}$ -Beladung gemessenen Kurven wurden benutzt, um den Brechungsindexsprung in den mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen aufgenommenen Bindungskurven zu korrigieren.

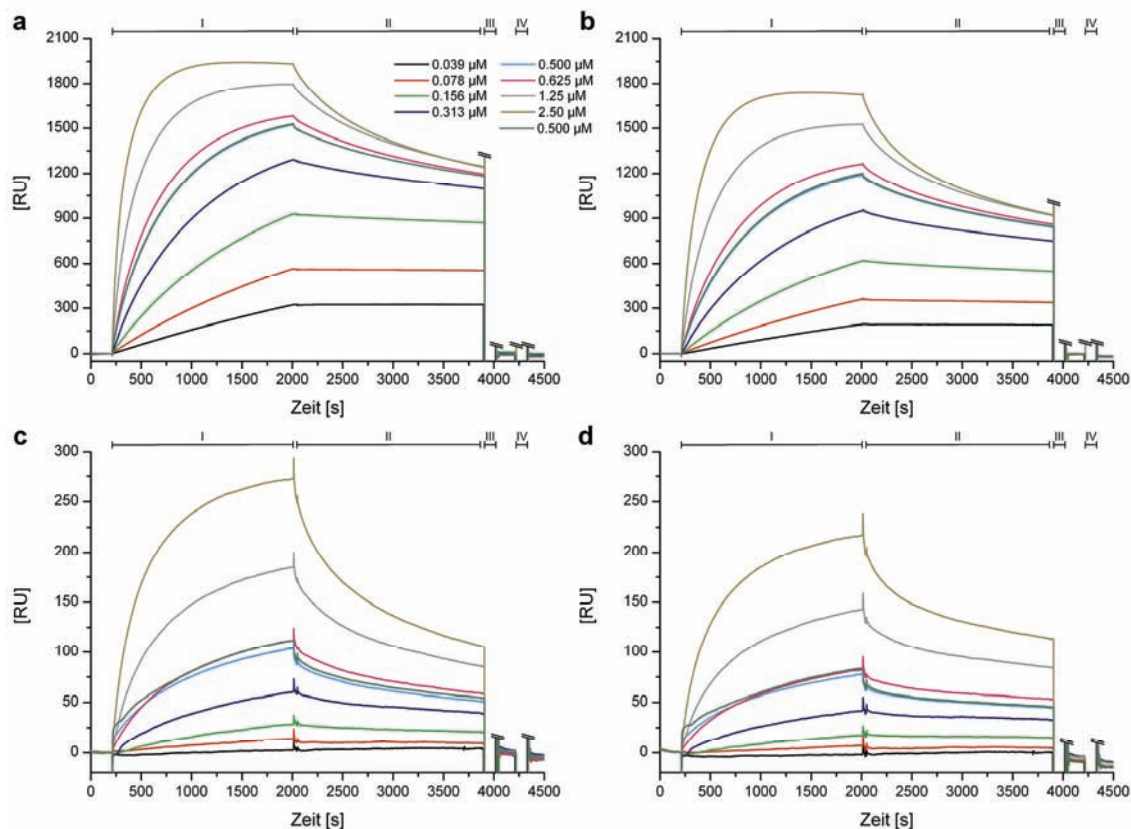
In **Abb. 62** sind die aufgenommenen Bindungskurven für MBP- $H_6$  auf den vier unbelichteten P*Attris*NTA-Oberflächen dargestellt. Auf den P*Attris*NTA-Oberflächen mit drei und vier Histidinen (**Abb. 62 a** und **b**) war eine geringe, transiente Proteinbindung detektierbar. Bei den Oberflächen mit fünf und sechs Histidinen war

eine sehr schwache Wechselwirkung nur für die höchste Proteinkonzentration (2.5  $\mu\text{M}$ ) messbar (**Abb. 62 c und d**). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Experimenten in Lösung ließ sich sagen, dass fünf Histidine benötigt wurden, um eine effektive Selbstinaktivierung des *tris*NTAs zu erzielen.



**Abb. 62:** Bindungskurven für verschiedene Konzentrationen von MBP-H<sub>6</sub> auf den selbstinaktivierten PATrisNTA-Oberflächen. **(a)** *tris*-CAnpH<sub>3</sub> (**37**)-, **(b)** *tris*-CAnpH<sub>4</sub> (**38**)-, **(c)** *tris*-CAnpH<sub>5</sub> (**39**)- und **(d)** *tris*-CAnpH<sub>6</sub> (**40**)-Oberfläche. Die Proteinassoziation (I) und Dissoziation (II) wurden für jeweils 30 min aufgenommen, gefolgt von einer Imidazol- (III) und EDTA-Injektion (IV). Die Beladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen ist nicht gezeigt.

**Abb. 63** zeigt die Bindungskurven für MBP-H<sub>10</sub> auf den vier Oberflächen. Die Messungen zeigten im Prinzip die gleichen Ergebnisse wie für das MBP-H<sub>6</sub>, nämlich dass die Effektivität der Selbstinaktivierung des *tris*NTAs auf der Oberfläche von der Anzahl der Histidine im PATrisNTA abhing. Außerdem war auch für das MBP-H<sub>10</sub> ein deutlicher Unterschied in der transienten Proteinbindung auf den Oberflächen mit drei und vier bzw. fünf und sechs Histidinen erkennbar. Insgesamt wurde, aufgrund des längeren His-Tags am MBP und der damit stabileren Bindung, mehr Protein gebunden.

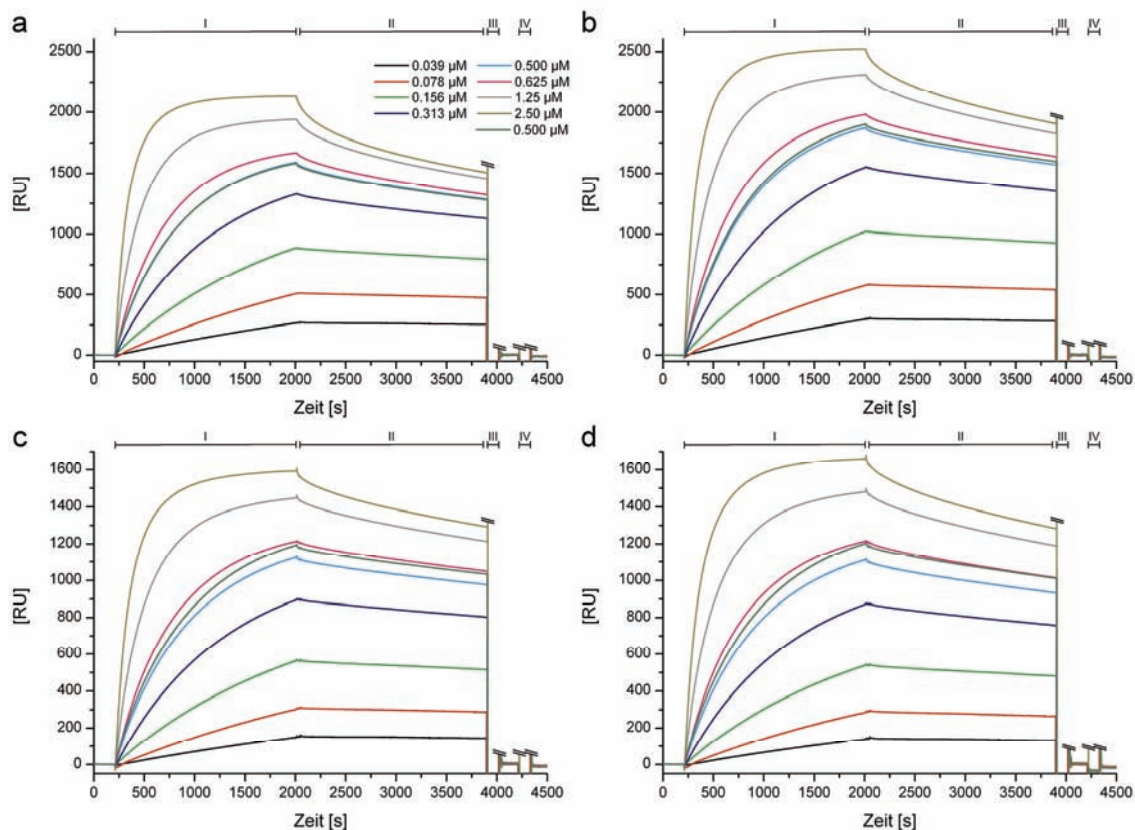


**Abb. 63:** Bindungskurven für verschiedene Konzentrationen von MBP-H<sub>10</sub> auf den selbstinaktivierten P*ATris*NTA-Oberflächen. **(a)** *tris*-CAnpH<sub>3</sub> (**37**)-, **(b)** *tris*-CAnpH<sub>4</sub> (**38**)-, **(c)** *tris*-CAnpH<sub>5</sub> (**39**)- und **(d)** *tris*-CAnpH<sub>6</sub> (**40**)-Oberfläche. Die Proteinassoziation (I) und Dissoziation (II) wurden für jeweils 30 min aufgenommen, gefolgt von einer Imidazol- (III) und EDTA-Injektion (IV). Die Beladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen ist nicht gezeigt.

Für beide MBPs wurde auf den inaktivierten Oberflächen eine Dissoziationskinetik beobachtet, deren Geschwindigkeit mit steigender Anzahl an intramolekularen Histidinen zunahm. Dieser Effekt und die transiente Interaktion während der Assoziation wurden durch die intramolekularen Histidine der P*ATris*NTAs hervorgerufen. Die effektive Konzentration der inaktivierenden Histidine ist höher als die des intermolekularen His-*Tags* am Protein. Dadurch kann das thermodynamisch stabiler gebundene Protein leicht von der Oberfläche verdrängt werden. Für die P*ATris*NTAs mit drei (**37**) und vier (**38**) Histidinen ist dieser Effekt, aufgrund der geringeren Anzahl an intramolekularen, inaktivierenden Histidinen, weniger stark ausgeprägt, aber besonders für das MBP-H<sub>6</sub> noch gut zu erkennen.



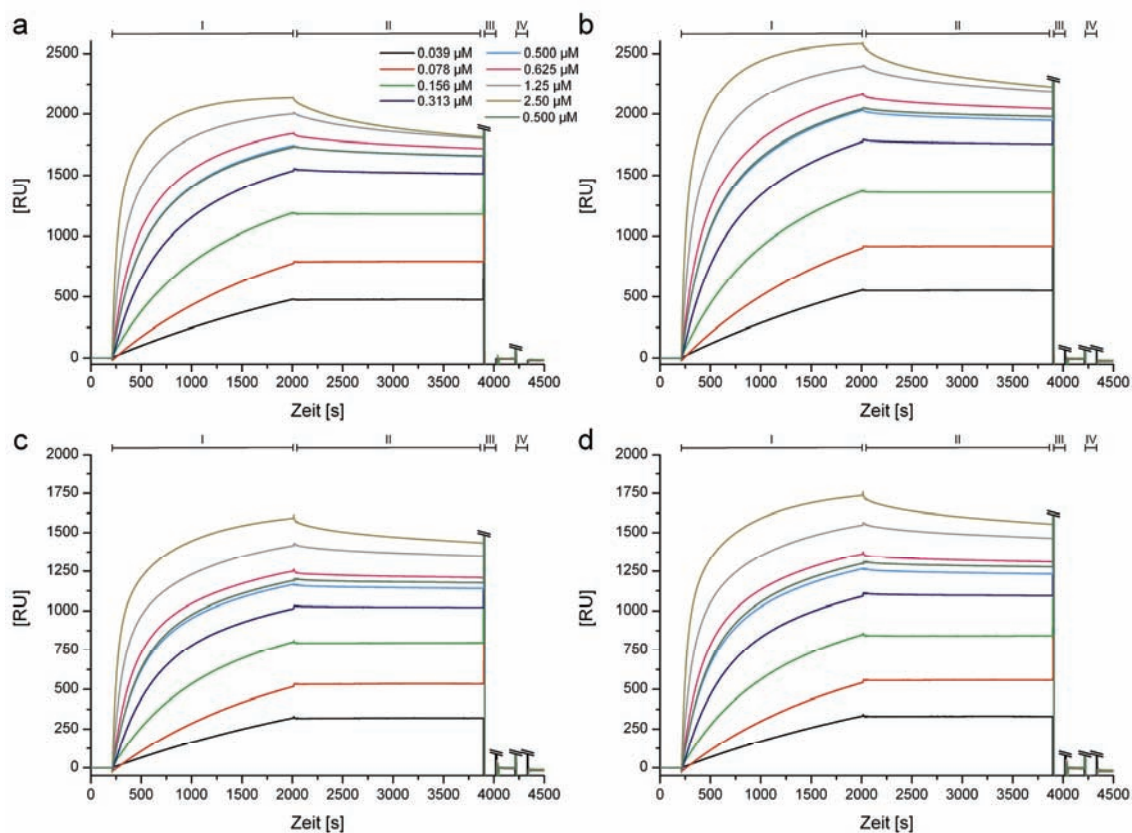
Die Oberflächen wurden anschließend für 30 min mit UV-Licht (366 nm) aktiviert, und die Bindungsstudien wurden, wie für die selbstinaktivierten Oberflächen beschrieben, wiederholt. In **Abb. 64** sind die Bindungskurven für MBP-H<sub>6</sub> dargestellt.



**Abb. 64:** Bindungskurven für verschiedene Konzentrationen von MBP-H<sub>6</sub> auf den photoaktivierten PATrisNTA-Oberflächen. **(a)** *tris*-CAnpH<sub>3</sub> (**27**)-, **(b)** *tris*-CAnpH<sub>4</sub> (**28**)-, **(c)** *tris*-CAnpH<sub>5</sub> (**29**)- und **(d)** *tris*-CAnpH<sub>6</sub> (**30**)-Oberfläche. Die Proteinassoziation (I) und Dissoziation (II) wurden für jeweils 30 min aufgenommen, gefolgt von einer Imidazol- (III) und EDTA-Injektion (IV). Die Beladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen ist nicht gezeigt.

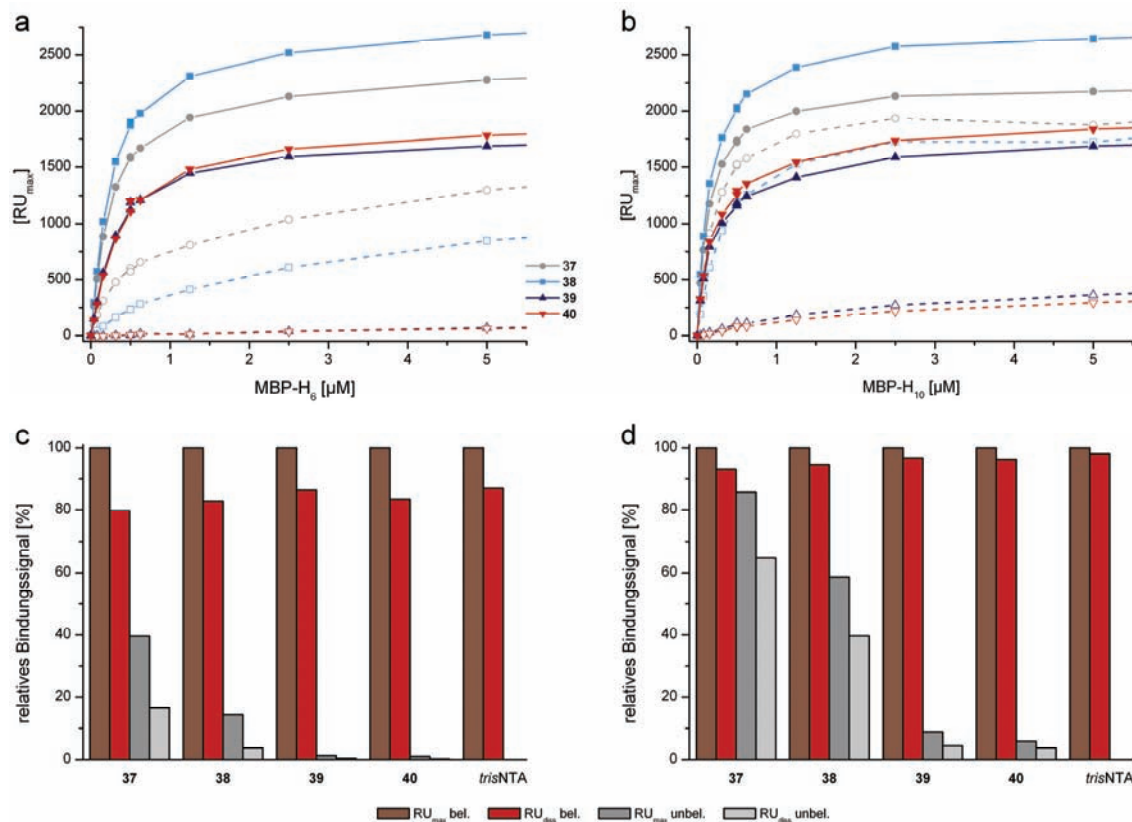
**Abb. 65** gibt die Ergebnisse für das MBP-H<sub>10</sub> wieder. Nach der Photoaktivierung wurde von beiden MBPs deutlich mehr Protein auf den Oberflächen spezifisch immobilisiert als vor der Belichtung. Außerdem wurde, wie zu erwarten war, in etwa gleich viel Protein auf allen vier Oberflächen gebunden. Variationen im maximalen Bindungssignal sind auf leichte Unterschiede in den PATrisNTA-Konzentrationen während der Oberflächenkupplung zurückzuführen. Durch das Fehlen der intramolekularen, inaktivierenden Histidine wurde die stabile Komplexierung des MBPs an die Oberfläche ermöglicht. Der größte Unterschied im Bindungsverhalten vor und nach der Photoaktivierung war für die Oberflächen mit fünf und sechs inaktivierenden

Histidinen zu beobachten. Diese zeigten vor der Aktivierung eine effektive Selbstinaktivierung durch die intramolekularen Histidine.



**Abb. 65:** Bindungskurven für verschiedene Konzentrationen von MBP-H<sub>10</sub> auf den photoaktivierten PAt<sub>ris</sub>NTA-Oberflächen. **(a)** *tris*-CAnpH<sub>3</sub> (**37**)-, **(b)** *tris*-CAnpH<sub>4</sub> (**38**)-, **(c)** *tris*-CAnpH<sub>5</sub> (**39**)- und **(d)** *tris*-CAnpH<sub>6</sub> (**40**)-Oberfläche. Die Proteinassoziation (I) und Dissoziation (II) wurden für jeweils 30 min aufgenommen, gefolgt von einer Imidazol- (III) und EDTA-Injektion (IV). Die Beladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen ist nicht gezeigt.

Die wichtigsten Ergebnisse aus diesen SPR-Messungen lassen sich zusammenfassen, wenn man die maximalen ( $RU_{max}$ ) sowie die dazu relativen Bindungssignale betrachtet. Die Auftragung der  $RU_{max}$ -Werte gegen die MBP-Konzentration zeigt deutlich, dass die Inaktivierung des *tris*NTAs durch die intramolekularen Histidine möglich war, wenn mindestens fünf Histidine vorhanden waren (**Abb. 66 a, b**).



**Abb. 66:** Maximale ( $RU_{max}$ ) und relative Bindungssignale aus den SPR-Experimenten.  $RU_{max}$ -Werte für unterschiedliche Konzentrationen von MBP-H<sub>6</sub> (**a**) und MBP-H<sub>10</sub> (**b**) auf den vier inaktivierten (gestrichelte Linien) und aktivierten (durchgezogene Linien) P $ATris$ N $T$ A-Oberflächen. Relative Bindungssignale für 0.625  $\mu M$  MBP-H<sub>6</sub> (**c**) und MBP-H<sub>10</sub> (**d**) in Abhängigkeit von der Anzahl der Histidine im P $ATris$ N $T$ A. Der maximale Bindungswert nach der Belichtung ( $RU_{max}$  bel., dunkelrot) wurde für jede Oberfläche auf 100% gesetzt. Im Verhältnis dazu sind die Bindungssignale nach der Assoziation ( $RU_{max}$ ) und Dissoziation ( $RU_{diss}$ ) für die inaktivierten (unbel., graue Balken) und aktivierten (bel., rote Balken) Oberflächen aufgetragen. Als Vergleich ist jeweils die Proteinbindung auf einer nicht aktivierbaren *tris*N $T$ A-Oberfläche angeführt.

Besonders im Falle des His<sub>10</sub>-getaggten MBPs war deutlicher zu erkennen, dass auf den inaktivierten Oberflächen (**Abb. 66 b**; gestrichelte Linien) mit drei (grau) und vier (hellblau) Histidinen eine Proteinbindung stattfinden konnte. Im Falle von fünf (**Abb. 66**; blau) und sechs (rot) Histidinen hingegen war keine Immobilisierung erkennbar. Außerdem demonstrierten die Ergebnisse eindeutig, dass, im Falle von fünf oder sechs Histidinen, aufgrund der Proteinbindung zwischen inaktivierten (**Abb. 66**; gestrichelte Linien) und aktivierten (durchgezogene Linien) Oberflächen unterschieden werden konnte.

Die relativen Bindungssignale für 0.625  $\mu$ M MBP-H<sub>6</sub> (**Abb. 66 c**) und MBP-H<sub>10</sub> (**Abb. 66 d**) verdeutlichen zum einen noch einmal diesen Unterschied, zum anderen zeigen sie die Stabilität der Bindung. Für jede einzelne Oberfläche wurde das maximale Bindungssignal ( $RU_{\max}$ ) nach der Photoaktivierung (**Abb. 66**; dunkelrote Balken) auf 100% gesetzt. Relativ dazu wurden die Bindungssignale nach 30 min Dissoziation ( $RU_{\text{diss}}$ ) von den inaktivierten (**Abb. 66**; hellgraue Balken) und aktivierten (rote Balken) Oberflächen, sowie das maximale Bindungssignal ( $RU_{\max}$ ) für die inaktivierten Oberflächen (graue Balken) aufgetragen. Der direkte Vergleich machte deutlich, dass sowohl die Menge des immobilisierten MBPs, als auch die Stabilität der entstandenen Bindung von der Länge des *His-Tags* im Protein abhing. Die Bindung auf den inaktivierten Oberflächen (**Abb. 66**; graue Balken) zeigte zudem einen klaren Zusammenhang mit der Anzahl der intramolekularen, inaktivierenden Histidine im *PAt<sub>ris</sub>NTA*. Außerdem wurde auf den inaktivierten Oberflächen mit keinem der Proteine eine stabile Immobilisierung erreicht. Die Effizienz der Selbstinaktivierung nahm mit steigender Anzahl an intramolekularen Histidinen ebenfalls zu. Nach der Photoaktivierung (**Abb. 66**; rote Balken) verhielten sich die *PAt<sub>ris</sub>NTA*-Oberflächen in Bezug auf die Proteinbindung wie Oberflächen mit nicht aktivierbaren *tris*NTA-Gruppen.

Die SPR-Studien zeigten, dass das Prinzip der *PAt<sub>ris</sub>NTAs* an Oberflächen ausgezeichnet funktionierte. Aus den erhaltenen Daten war zu erkennen, dass eine Strukturierung der Oberflächen durch UV-Licht möglich sein sollte. Dabei war das Ausmaß der Selbstinaktivierung eindeutig von der Anzahl der Histidine im *PAt<sub>ris</sub>NTA* abhängig. Für eine effektive Inaktivierung des *tris*NTAs waren, wie in Lösung, mindestens fünf intramolekulare Histidine notwendig. Daher sollte das *tris-CAnpH<sub>5</sub>* (**39**) für die strukturierte Immobilisierung von *His-getaggen* Proteinen verwendet werden.

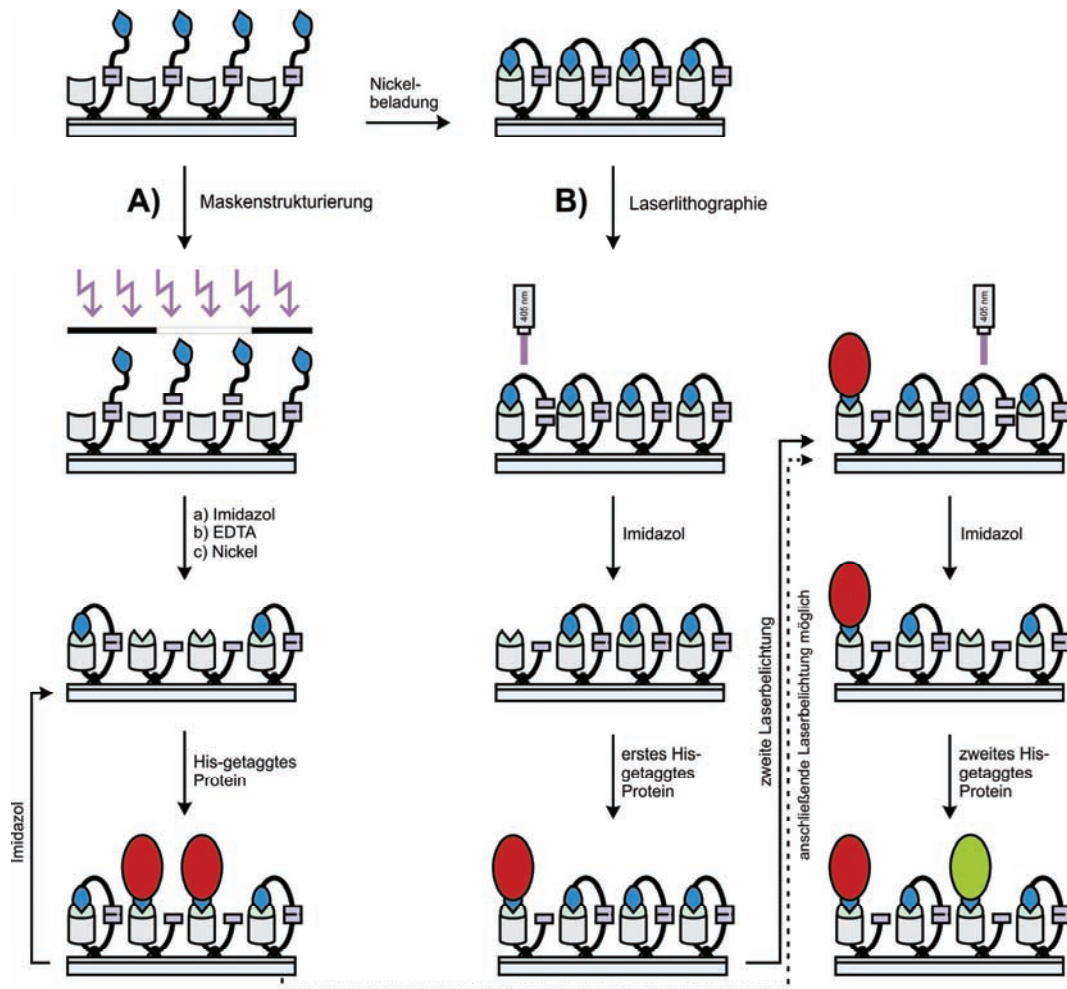
## V.5.2.5.2 Visualisierung immobilisierter Proteine

### V.5.2.5.2.1 Strukturierung von P*A**tris*NTA-Oberflächen

Die Visualisierung immobilisierter Proteine wird bei der Verwendung von fluoreszenten Proteinen durch die Fluoreszenzmikroskopie einfach und schnell ermöglicht. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden anstelle von Gold-Glasoberflächen verwendet, weil Fluorophore auf leitenden Oberflächen stark gequench werden.

Das *tris*-CAnpH<sub>5</sub> (**39**), welches in den SPR-Experimenten einen deutlichen Unterschied in der Bindung von MBP-H<sub>10</sub> vor und nach der Photoaktivierung zeigte, wurde über das Cystein erfolgreich auf ein mit PEG beschichtetes Deckglas aufgebracht. Die Belichtung solcher Oberflächen in bestimmten Bereichen sollte zu einer Strukturierung führen, da His-*getaggte* Proteine nur in den belichteten Regionen stabil an die Oberfläche gebunden werden konnten.

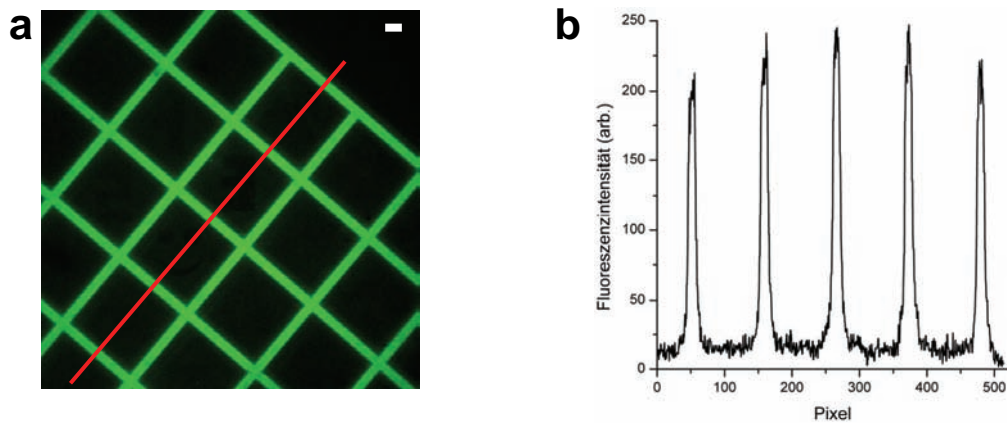
Die Strukturierung der Oberflächen wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Zum einen wurde eine Quarzglas-Maske mit einem Chrom-Gittermuster verwendet (**Schema 26 A**). Diese wurde während der Belichtung mit UV-Licht (280-400 nm) auf der P*A**tris*NTA-Oberfläche platziert. Die Oberfläche wurde nach dem Belichten wie zuvor in den SPR-Experimenten mit Imidazol, EDTA und Ni<sup>2+</sup> behandelt. Zum anderen wurde die Aktivierung des P*A**tris*NTAs mit dem 405 nm Laser des CLS-Mikroskops durchgeführt (**Schema 26 B**). Bei der *in situ* Laserlithographie wurden bestimmte Bereiche der Ni<sup>2+</sup>-beladenen Oberflächen unterschiedlich lange dem Laserlicht ausgesetzt. Vor der Proteinimmobilisierung wurde mit 5 mM Imidazol gewaschen, um die generierten His-Peptide von den aktivierten *tris*NTAs zu entfernen. Die Größe und Form der belichteten Regionen ist bei dieser Methode frei wählbar. Auch eine Kombination aus beiden Methoden wurde durchgeführt und erlaubte die Immobilisierung verschiedener His-*getaggtter* Proteine auf einer Chipoberfläche.



**Schema 26:** Schematische Darstellung der zwei genutzten Möglichkeiten zur Strukturierung der PAtRisNTA-Oberflächen. **(A)** Strukturierung durch eine Chrom-Quarzglas Maske, die während der Photoaktivierung mit UV-Licht auf die Oberfläche gelegt wird. Die  $\text{Ni}^{2+}$ -Beladung erfolgt nach der Belichtung. Die Proteine binden nur in den Bereichen, in denen die Aktivierung stattfand. **(B)** Spaltung der  $\text{Ni}^{2+}$ -beladenen PAtRisNTAs durch den 405 nm Laser des Mikroskops. Die Spaltung mit dem Laser ermöglicht die Immobilisierung verschiedener Proteine durch die sukzessive Aktivierung verschiedener Chipregionen. Eine Kombination beider Methoden ist leicht umsetzbar.

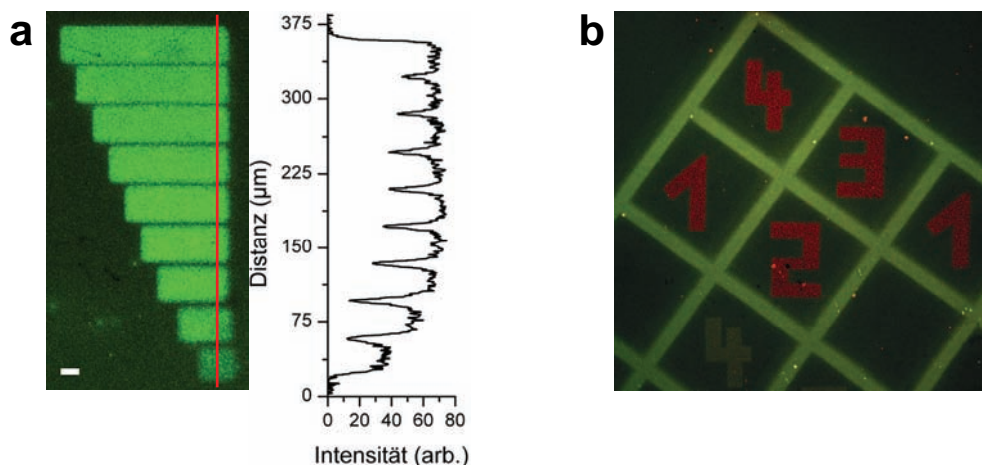
#### V.5.2.5.2.2 Strukturierte Immobilisierung His-getaggtter Proteine

Die Inkubation der maskenstrukturierten Oberflächen mit einem Alexa488-markierten MBP- $\text{H}_{10}$  (MBP(Alexa488)- $\text{H}_{10}$ ) führte zu dessen stabilen und spezifischen Immobilisierung in den belichteten Bereichen. Die Fluoreszenzaufnahmen solcher Oberflächen mit einem CLSM zeigten deutlich die Gitterstrukturen der verwendeten Maske (**Abb. 67 a**). Die erhaltenen Muster wiesen einen sehr hohen Kontrast und scharfe Strukturen auf. Auch die gleichmäßige Beladung der belichteten Regionen war gewährleistet (**Abb. 67 b**).



**Abb. 67:** (a) CLSM-Bild einer Gitterstruktur, die mit MBP(Alexa488)-H<sub>10</sub> (grün) beladen wurden. Die Strukturen wurden mit einer Maske erzeugt. Das Intensitätsprofil (b) zeigt die gleichmäßige Beladung der belichteten Bereiche in (a). Der weiße Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

In einem weiteren Schritt wurden auf demselben Chip in inaktivierten Bereichen definierte Regionen mittels *in situ* Laserlithographie aktiviert (**Abb. 68 a**). Die aktivierten Rechtecke wurden verschieden lange belichtet und wiesen eine eindeutige Korrelation zwischen der Lichtdosis und der anschließenden Proteinbindung auf. Je länger belichtet worden war, desto mehr Protein konnte stabil immobilisiert werden.



**Abb. 68:** (a) Unterschiedlich starke Aktivierung inaktivierter Bereiche mittels *in situ* Laserlithographie. Die Menge an gebundenem Protein korreliert mit der Lichtdosis. (b) Aufeinander folgende Immobilisierung zweier unterschiedlich markierter MBPs. Zuerst wurde die Gitterstruktur mit einer Maske erzeugt und MBP(Alexa488)-H<sub>10</sub> (grün) auf den Strukturen immobilisiert. In einem zweiten Schritt wurden die Zahlen mittels Laserlithographie geschrieben, und die Oberfläche wurde mit MBP(ATTO565)-H<sub>10</sub> (rot) inkubiert.

Nachdem der Chip mit einer Maske strukturiert und mit MBP(Alexa488)-H<sub>10</sub> beladen war, wurde die Organisation eines zweiten Proteins mittels *in situ* Laserlithographie realisiert. In den neu aktivierten Regionen wurde MBP(ATTO565)-H<sub>10</sub> immobilisiert (**Abb. 68 b**). Die simultane Abbildung beider Farbstoffe zeigte deutlich, dass das MBP(ATTO565)-H<sub>10</sub> fast ausschließlich auf den neu aktivierten Regionen immobilisiert worden war. Auf den zuvor generierten und beladenen Gitterstrukturen konnte nur wenig MBP(ATTO565)-H<sub>10</sub> nachgewiesen werden. Dies war entweder auf freie *tris*NTA-Bindungsplätze in der Gitterstruktur zurückzuführen, oder aber es kam zu einem nahezu vernachlässigbarem Proteinaustausch auf den Gitterstrukturen. Die mittels *in situ* Laserlithographie generierten Strukturen wiesen ebenfalls einen hohen Kontrast und scharfe Kanten auf.

Die Methode mit der Maske eignet sich gut, wenn große Bereiche einer Oberfläche schnell strukturiert werden sollen. Allerdings sind die Muster fest vorgeschrieben und lassen sich nicht einfach ändern. Außerdem erlaubt das Verwenden der Maske keine orthogonale Immobilisierung mehrerer Proteine, weil sie auf der Oberfläche aufliegt. Im Gegensatz zur Strukturierung mit einer Maske ist die Verwendung der Laserlithographie sehr zeitaufwändig und dadurch besonders für größere Bereiche nicht sehr praktikabel. Dafür kann die Gestalt und Anzahl der aktivierten Bereiche frei gewählt. Durch die Verwendung der Laserlithographie *in situ* können His-*getaggte* Proteine außerdem orthogonal immobilisiert werden. Ein abwechselndes Aktivieren der Oberfläche und Immobilisieren des entsprechenden Proteins erlaubt die Organisation verschiedenster Biomoleküle auf einer Oberfläche.

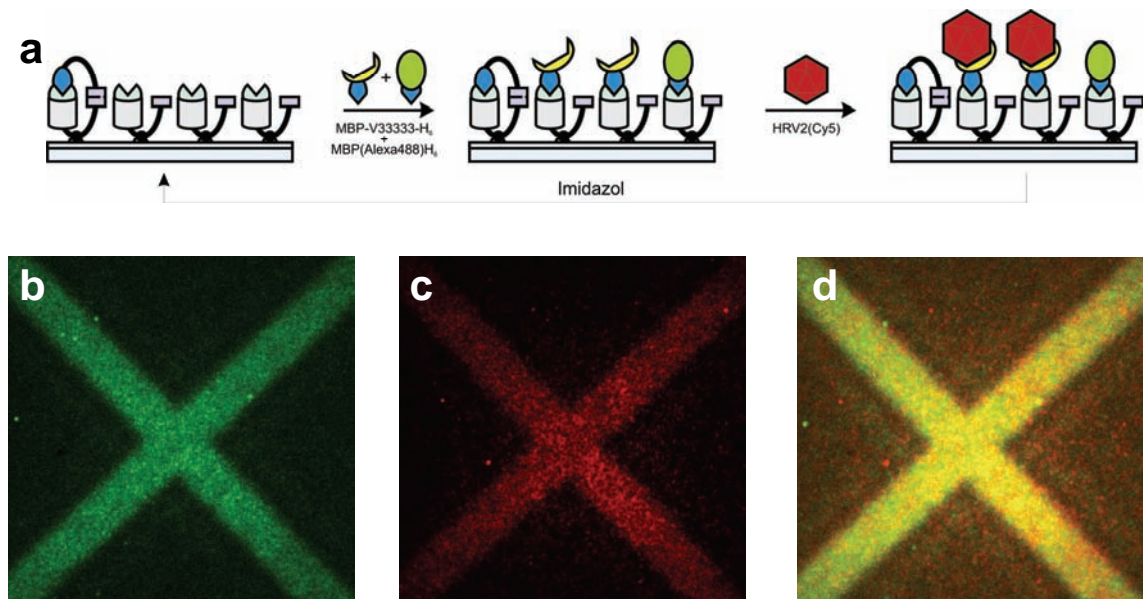
Nachdem gezeigt worden war, dass Proteine strukturiert auf der P*ATris*NTA-Oberfläche immobilisiert werden können, sollte deren Biokompatibilität überprüft werden. Für moderne Proteinchips ist die Immobilisierung unter physiologischen Bedingungen und unter Erhalt der Aktivität des Proteins von großer Bedeutung.

#### **V.5.2.5.2.3 Strukturierte Immobilisierung biologisch aktiver Proteine**

Um zu demonstrieren, dass die auf den strukturierten P*ATris*NTA-Oberflächen immobilisierten Proteine ihre biologische Aktivität behielten, wurde ein His<sub>6</sub>-*getaggt*es Rezeptorfragment auf maskenstrukturierten Oberflächen gebunden. Bei dem Rezeptorfragment handelte es sich um ein Lipoprotein sehr geringer Dichte (VLDL, *very low-density lipoprotein*) mit fünf identischen Einheiten (MBP-V33333-H<sub>6</sub>),



welches den humanen Rhinovirus Serotyp 2 (HRV2) mit hoher Affinität binden kann<sup>267</sup>. HRV2 ist einer der Hauptursachen für virale Erkältungen und damit von großer medizinischer Relevanz. Die Bindung des Cy5-markierten HRV2s an das zuvor immobilisierte MBP-V33333-H<sub>6</sub> wurde mittels hoch sensitiver TIRF-Mikroskopie untersucht. Da das Rezeptorfragment nicht fluoreszenzmarkiert war, wurde es vor der Immobilisierung mit MBP(Alexa488)-H<sub>6</sub> im molaren Verhältnis 20:1 gemischt (**Abb. 69 a**).



**Abb. 69:** TIRF-Mikroskopie zur Demonstration der Biokompatibilität der *tris*-CAnpH<sub>5</sub> (**29**)-Oberflächen. **(a)** Schematische Darstellung der Virusbindung an immobilisierte, biologisch aktive Rezeptoren. **(b)** Fluoreszenzbild von immobilisiertem MBP-V33333-H<sub>6</sub> und MBP(Alexa488)-H<sub>6</sub> (grün) im molaren Verhältnis 20:1 auf maskenstrukturierten Oberflächen. **(c)** Fluoreszenzbild von rezeptorgebundenem HRV2(Cy5) (rot). **(d)** Die Überlagerung von **(b)** und **(c)** zeigt deutlich die hohe Übereinstimmung der erhaltenen Fluoreszenzsignale.

Für die Visualisierung der Rezeptorebene wurde das MBP(Alexa488)-H<sub>10</sub> mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt ( $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) und zeigte die Immobilisierung ausschließlich in den zuvor aktivierten Bereichen (**Abb. 69 b**). Für den gebundenen Virus wurde dasselbe Muster mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm erhalten ( $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$ ; **Abb. 69 c**). Das Überlagerungsbild zeigt deutlich, dass der Virus ausschließlich in den Regionen zu finden war, in denen zuvor der Rezeptor immobilisiert worden war (**Abb. 69 d**). Dies bewies die hohe Biokompatibilität der PATrisNTA-Oberflächen.

### V.5.3 Schlussfolgerung

Die synthetisierten *PAtris*NTAs sind aufgrund ihrer nanomolaren Bindungseigenschaften im aktivierten Zustand ideal für die getriggerte Markierung *His-getaggtter* Proteine geeignet. Für die effektive Selbstinaktivierung des *tris*NTAs waren in Lösung und an Oberflächen mindestens fünf intramolekulare Histidine notwendig. Die Aktivierung durch Licht ermöglichte die strukturierte Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen. Durch die Anwendung von *in situ* Laserlithographie konnte außerdem die sukzessive Immobilisierung verschiedener *His-getaggtter* Proteine auf einfache Art und Weise realisiert werden. Das Ausmaß der Aktivierung, und damit die Menge an gebundenem Protein, korrelierte dabei mit der Lichtdosis. Die hohe Biokompatibilität der Oberflächen wurde durch die organisierte Immobilisierung eines funktionalen VLDL-Rezeptorfragments demonstriert. Damit erfüllen die *PAtris*NTA-Oberflächen die wichtigsten Voraussetzungen für den Einsatz als Grundlage für Proteinbiochips.

### V.5.4 Ausblick

Die durchgeführten Studien haben gezeigt, dass die gewählten Konstrukte das Prinzip der Photoaktivierung des *tris*NTAs vollständig erfüllen, es aber einige Angriffspunkte für Verbesserungen und Erweiterungen des Systems gibt:

- I. Es wurde deutlich, dass mindestens fünf Histidine im *PAtris*NTA benötigt werden, um eine effektive Inaktivierung des *tris*NTAs zu gewährleisten. Allerdings wurde auch klar, dass der durch die Belichtung gebildete intermolekulare *tris*NTA/His<sub>5</sub>-Komplex eine hohe Stabilität aufweist und selbst als Kompetitor nach der Abspaltung wirkt. Um diese zu senken, und damit eine verbesserte Markierung von *His-getaggtten* Proteinen in Lösung zu erreichen oder die sukzessive Immobilisierung mehrerer Proteine auf Oberflächen zu erleichtern, kann das photolabile *Anp* in die intramolekularen Histidine des *PAtris*NTAs integriert werden. Da nicht klar ist, ob das *Anp* die Affinität des *tris*NTAs für die inaktivierenden Histidine beeinflusst, sollte nicht nur mit fünf, sondern auch mit sechs Histidinen gearbeitet werden. Es würden sich folgende Konstrukte ergeben:

*tris*NTA-ACSGGGSGGGH $HAnp$ HHH und

*tris*NTA-ACSGGGSGGGHH $HAnp$ HHH

Bei der Anzahl der nach der Aktivierung am *tris*NTA verbleibenden Histidine

handelt es sich somit um zwei oder drei. Die hier durchgeführten Experimente haben eindeutig gezeigt, dass die Stabilität eines *tris*NTA/His<sub>3</sub>-Komplexes nicht ausreicht, um eine intermolekulare His-Tag Bindung komplett zu unterbinden. Daher könnten diese Konstrukte große Vorteile bringen.

- II. Die Länge des flexiblen Linkers wurde bisher noch nicht untersucht. Es ist durchaus denkbar, dass durch eine Verlängerung oder auch Verkürzung eine noch stabilere Inaktivierung erreicht werden kann. Ebenfalls denkbar ist die Verwendung flexibler Oligoethylenglykole als Linker.
- III. Durch die angesprochenen Veränderungen sollten die PA*tris*NTAs einen höheren Nutzen für die Markierung von His-*getaggt*en Proteinen in Lösung bekommen. Soll Fluoreszenz zum Auslesen eines Signals genutzt werden, so besteht allerdings ein Hintergrundproblem, da das PA*tris*NTA, egal ob frei oder gebunden, immer fluoresziert. Daher wäre die Einführung eines Quenchers, der durch die Photospaltung mit dem His-Peptide abgespalten wird, denkbar. Der Quencher müsste sich somit C-terminal befinden. Durch die Photospaltung würde dann nicht nur das *tris*NTA aktiviert werden, sondern auch die Fluoreszenzintensität enorm ansteigen.
- IV. Alle bisherigen Studien wurden *in vitro* durchgeführt. Für das markieren von His-*getaggt*en Proteinen *in vivo* wäre es wichtig, das PA*tris*NTA in die Zelle einzuschleusen. Die intramolekulare Inaktivierung sollte dies realisierbar machen und ein eventuelles unspezifisches Binden des *tris*NTAs innerhalb der Zelle verhindern. Um die Konstrukte membrangängig zu machen, könnten die Aminosäuren des flexiblen Linkers gegen acht bis zehn D-Arginine ausgetauscht werden. Von argininreichen Peptiden ist bekannt, dass sie in die Zelle transportiert werden. In Verbindung mit einem Fluoreszenzquencher, wie unter III. beschrieben, sollten *in vivo* Markierungen von His-*getaggt*en Proteinen mit niedrigem Hintergrundsignal möglich sein.
- V. Die PA*tris*NTAs könnten auch genutzt werden, um zwei Proteine in Lösung oder an der Zelloberfläche gezielt zu dimerisieren. Dazu müsste das PA*tris*NTA kovalent an eines der beiden Proteine angebracht werden. Realisierbar wäre dies z.B. über eine Disulfidbrücke mit einer *single-cysteine* Mutante oder über einen SNAP-*getaggt*es Protein mit einem Konstrukt aus PA*tris*NTA und O<sup>6</sup>-Benzylguanin. Würden diese PA*tris*NTA modifizierten Proteine mit einem His-*getaggt*en Protein gemischt, so

könnte deren Dimerisierung durch Licht induziert werden. Die durch die Dimerisierung hervorgerufenen biochemischen Abläufe könnten gezielt gestartet und untersucht werden.

VI. Für Studien mit lebenden Zellen sind die vorgestellten Oberflächen noch nicht anwendbar, weil durch das PEG die Zelladhäsion verhindert wird. Durch den Aufbau von gemischten Oberflächen aus *PA**tris*NTA und z.B. RGD-Peptiden sollte die Adhäsion von Zellen ermöglicht werden. Lässt man nun Zellen mit extrazellulären *His-Tags* auf zuvor strukturierten Oberflächen adhären, so sollten sich die *His-getaggten* Proteine in der Zellmembran auf den belichteten Strukturen anreichern. Eine Charakterisierung könnte bei Verwendung fluoreszierender *His-getaggter* Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Ebenso ist es denkbar, die *PA**tris*NTAs auf den Oberflächen mittels *in situ* Laserlithographie zu aktivieren, nachdem eine Zelladhäsion stattgefunden hat. Dies würde die lichtinduzierte, orts aufgelöste Assemblierung der *His-getaggten* Proteine in der Zellmembran zur Folge haben. Durch solch einen Vorgang ausgelöste biochemische Prozesse könnten somit gezielt mittels Licht gestartet und analysiert werden.

## VI ZUSAMMENFASSUNG

Die gezielte Modifikation von Proteinen für die Erforschung des Proteoms stellt eine entscheidende Herausforderung dar. Sie wird meistens dann zwingend notwendig, wenn das intrinsische Signal zum Auslesen ungeeignet ist. So ist es z.B. für die größte Anzahl von fluoreszenzbasierenden Methoden unerlässlich, das zu untersuchende Protein spezifisch und einheitlich mit einem Fluorophor zu markieren. Eine weitere Schwierigkeit ist die gerichtete Immobilisierung von Proteinen für deren Charakterisierung an Oberflächen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die spezifische Markierung, Manipulation und strukturierte Immobilisierung von rekombinanten Proteinen analysiert. Dafür wurde mit dem hauptsächlich aus der Proteinreinigung bekannten NTA/Oligohistidin-System gearbeitet. Verwendet wurden multivalente NTA-Chelatorköpfen mit zwei (*bis*NTA), drei (*tris*NTA) oder vier (*tetrakis*NTA) NTA-Gruppen pro Molekül. Durch die Multivalenz können hervorragende Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich erzielt werden, die die stabile, stöchiometrische, nicht kovalente und damit reversible Modifikation His-*getagter* Proteine in Lösung und an Grenzflächen erlaubt.

Fluoreszente *tris*NTAs wurden vielfach erfolgreich für die Markierung His-*getagter* Proteine eingesetzt. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass die Ni<sup>2+</sup>-Ionen im *tris*NTA die Emission des benachbarten Fluorophors stark quenchen und dadurch die Einsatzmöglichkeiten der Verbindung reduzieren. Durch die räumliche Trennung der beiden Gruppen mit starren, biokompatiblen Polyprolin-Helices konnte erstmals systematisch demonstriert werden, dass das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung abstandsabhängig ist. Bei der Verwendung von 12 Prolinen (3.6 nm lange Helix) wurde mit einem ATTO565-Derivat eine Intensitätserhöhung um etwa 70%, und bei einem OregonGreen488-Derivat um etwa 40% erreicht. Bei den Verbindungen können der Abstand der beiden Gruppen voneinander und der Fluorophor nahezu frei gewählt werden, so dass eine Optimierung in Hinblick auf die jeweilige Fragestellung ohne Probleme möglich ist. In Kooperationen untersucht wurden z.B. die ATP-Hydrolyse von MDL1 und die ATP-Bindung von TAP. Die deutlich verbesserte Quantenausbeute, die stabile Bindung an einen His-*Tag* und die geringe Größe machen die Verbindungen zu idealen Reportersonden für die Einzelmolekül-Fluoreszenz-Analyse.

Die gezielte Manipulation eines makromolekularen Proteinkomplexes mit einem kleinen Molekül wurde in einem weiteren Projekt untersucht. Das *tetrakis*NTA wurde

verwendet, um die His-*getaggt*en Eingänge des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* gezielt zu blockieren. Durch den Abbau von Fluoreszein-markiertem Casein konnte die Aktivität der Proteasomkomplexe in Echtzeit verfolgt werden. Unter Zugabe von *tetrakis*NTA fand kein Abbau statt, während dieser ohne oder nach Entfernen der *tetrakis*NTAs von den Eingängen im gleichen Maße detektierbar war. Die Aktivität der Peptidase-Schnittstellen im blockierten Zustand konnte durch die Überschichtung eines nativen Gels mit einem Peptidsubstrat demonstriert werden. Die Ergebnisse belegen, dass die His-*Tags* an den Eingängen des Proteasomkomplexes so umstrukturiert werden, dass der Eintritt von Proteinen reversibel blockiert wird. Neben der gezielten Manipulation des Proteasoms wurde außerdem erstmals die spezifische Fluoreszenzmarkierung His-*getaggt*er Proteine in kompletten *E. coli* Zelllysaten mittels nativer PAGE nachgewiesen.

Um neue Anwendungsgebiete für das *tris*NTA zu erschließen, sollte dieses mit einem 1.4 nm großen Goldcluster modifiziert werden. Damit könnte die Position von His-*Tags* in Proteinkomplexen mittels Elektronenmikroskopie visualisiert werden. Mittels Gelfiltration mit MBP-H<sub>6</sub> wurde nachgewiesen, dass die entwickelten Goldcluster teilweise mehr als eine *tris*NTA-Gruppe auf der Oberfläche hatten, wobei eine Trennung der Partikel nach der Anzahl der NTA-Gruppen nicht möglich war. Die Partikel wurden erfolgreich für die spezifische Markierung des  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> Proteasoms verwendet. In der Einzelpartikelanalyse deutlich erkennbar waren der markierte Proteasomkomplex und die Lage des *tris*NTA-Goldclusters. Die Verwendung solcher Goldpartikel in der EM bringt entscheidende Vorteile im Hinblick auf die Strukturaufklärung von Proteinen mit sich.

Orthogonale NTA/His-*Tag* Bindungspaare, bei denen ein bestimmtes, multivalentes NTA-Molekül einen definierten His-*Tag* bindet, würden einen großen Nutzen für die spezifische Markierung oder Immobilisierung verschiedener His-*getaggt*er Proteine bringen. Durch die Verwendung teilweise rigider His-*Tags* und möglichst starrer *bis*NTAs sollten solche Bindungspaare realisiert werden. Die Synthese rigider *bis*NTAs mit unterschiedlichen Abständen zwischen den NTA-Gruppen konnte erfolgreich etabliert werden. Allerdings zeigten Fluoreszenztitrationen mit verschiedenen Fluoreszein-markierten His-Peptiden nicht die erhofften Unterschiede in den Affinitäten.

Im letzten Teil der Arbeit wurden durch intramolekulare His-*Tags* inaktive *tris*NTAs synthetisiert. Diese können durch Licht gespalten und damit aktiviert werden

(photoaktivierbare *tris*NTAs, *PAtris*NTAs). Die Verbindungen mit unterschiedlicher Anzahl an Histidinen im intramolekularen *Tag* wurden systematisch in Lösung und an Oberflächen charakterisiert. Dazu wurden HPLC-Studien, Gelfiltrationen und SPR-Experimente durchgeführt. Die strukturierte Organisation von Proteinen auf solchen lichtaktivierbaren Oberflächen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie demonstriert. Außerdem konnten durch die Laserlithographie gezielt verschiedene *His-getaggte* Proteine *in situ* in definierten Bereichen immobilisiert werden. Die Biokompatibilität der Oberflächen wurde erfolgreich durch die strukturierte Organisation aktiver, Virusbindender Rezeptor-Partikel gezeigt. Im Prinzip sollte das Konzept die lichtinduzierte Aufkonzentrierung von *His-getagkten* Rezeptoren in lebenden Zellen ermöglichen. Durch das *Clustern* ausgelöste Vorgänge könnten so gezielt herbeigeführt und analysiert werden.

## VI.1 Summary

The specific modification of proteins plays a crucial role in the field of proteomics and is mostly mandatory if a read-out signal needs to be detected. E.g., for the majority of fluorescent assays a specific and unique labeling of the protein of interest with a fluorophor is required. Another important challenge is the directed immobilization of proteins at interfaces to contribute to their characterization.

The specific labeling, manipulation and structured immobilization of recombinant proteins were in the scope of this thesis. For this purpose, the well known NTA/oligohistidine system, widely used for protein purification, was applied. Multivalent NTA chelator heads with two (*bis*NTA), three (*tris*NTA) or four (*tetrakis*NTA) NTA groups per molecule were applied to the different projects. The multivalency causes excellent binding properties with nanomolar affinities, thus enabling a stable, stoichiometric, non covalent, and reversible modification of His-tagged proteins in solution and on solid supports.

Fluorescent *tris*NTAs have been widely used for the successful labeling of His-tagged proteins. Thereby the observation was made, that the Ni<sup>2+</sup> ions in the *tris*NTA quench the emission of the neighboring fluorophor, limiting the possible applications of the compounds. The spatial separation of the two groups by rigid, biocompatible polyproline helices was investigated systematically. It has been shown for the first time, that the quenching efficiency definitely depends on the distance between the *tris*NTA and the fluorophor. Insertion of 12 prolines leads to an increase in the fluorescence intensity of about 70% for an ATTO565-derivative and of about 40% for an OregonGreen488-derivative. The compounds can easily be adopted to any problem, as the distance between the two groups and the fluorophor can be chosen as required. Using appropriate constructs, the ATP-hydrolysis of MDL1 as well as the ATP-binding of TAP were studied in cooperations. Due to the obviously increased quantum yield, the stable binding to His-tagged proteins and the small size, the compounds are ideal probes for single molecule fluorescence studies.

The specific manipulation of a macromolecular protein complex by a small molecule was investigated in another project. The *tetrakis*NTA was chosen to specifically block the His-tagged entrances of the  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. The activity of the proteasome was monitored in real time by the degradation of



fluorescein-labeled casein. No degradation could be observed in the presence of *tetrakis*NTA. A clear and comparable activity was detectable without *tetrakis*NTA or after removal of the *tetrakis*NTA from the entrances. The remained peptidase activity of the blocked proteasomes was shown by covering a native gel with a peptide substrate. The results clearly demonstrated, that the His-tags at the entrances of the proteasome are reorganized by the *tetrakis*NTA and that this reorganization leads to a reversible blockage of the proteasome. Besides it has been shown successfully by native PAGE that the specific labeling of His-tagged proteins in complete *E. coli* cell lysates is feasible.

To open up a new field for application of the multivalent NTAs, the modification of the *tris*NTA with a 1.4 nm large gold cluster was another challenge. This would allow the visualization of the His-tag position within a protein complex by electron microscopy. As shown by gel filtration experiments with hexahistidine-tagged MBP, most of the gold clusters were functionalized with more than a single *tris*NTA group on their surfaces. Separation of the particles by the number of the *tris*NTA groups was not possible. The gold clusters were used successfully for the specific labeling of the  $\alpha$ N-His<sub>6</sub> proteasome. The labeled proteasome complexes as well as the positions of the gold clusters were clearly visible in single particle analysis using electron microscopy images. The application of such gold clusters in EM offers great advantages in the field of structure determination of proteins.

For the specific labeling or immobilization of different His-tagged proteins it would be beneficial to have access to orthogonal NTA/His-tag binding pairs, which means that a determined, multivalent NTA chelator head can only bind to a single defined His-tag. The project was to be realized by using partially rigid His-tags and preferably inflexible *bis*NTAs. Rigid His-peptides were realized by implementing stiff polyproline-helices between cumulated histidines. The synthesis of inflexible *bis*NTA compounds, possessing different distances between the two NTA groups, was accomplished successfully. However, fluorescence titrations with different fluorescein labeled His-peptides revealed no differences in binding affinities. It is likely, that the fluorescein interacts with the histidines. This interaction would disturb the measurement of the NTA/histidin interaction.

In the last project of this thesis it was planned to generate self-inactivated *tris*NTAs for the triggered modification of proteins. Therefore, *tris*NTAs with intramolecular His-

tags were synthesized, which formed an intramolecular complex upon loading with Ni<sup>2+</sup> ions. Variation of the number of inactivating histidines allows to control the efficiency of the self-inactivation. Activation is achieved by a photocleavage reaction, eliminating the inactivating, intramolecular His-tag and providing a free *tris*NTA. The versatility of these novel photoactivatable *tris*NTAs for *in vitro* protein labeling and immobilization was demonstrated in solution and on surfaces. Therefore, HPLC studies, gelfiltrations, and SPR experiments were performed. The structured organization of fluorescent proteins was demonstrated by CLSM. Multiplexing of different fluorescently labeled proteins in defined areas could be reached easily by laser lithography. Also proven was the acceptability of the biofunctional surfaces in a challenging physiological application where large, complex and macromolecular virus/receptor interactions were specifically probed. In principle, the concept should allow for the light triggered receptor clustering in living cells and investigation of the associated signal transduction processes.

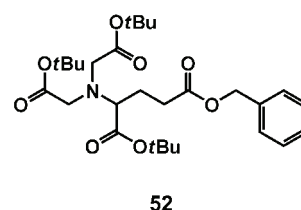
## VII CHEMISCHE SYNTHESSEN

### VII.1 Synthese von *tris*NTA und *tris*NTA-Derivaten

Die Vorstufen (**52**, **55**, **20**) und Derivate (**1**, **58**, **11**) des *tris*NTAs wurden überwiegend wie von LATA et al. beschrieben synthetisiert.<sup>94,188</sup> Bei den Thiol-Derivaten (**22**, **18**, **24**, **25**) handelt es sich um neu ausgearbeitete Synthesen.

#### VII.1.1 Glu-NTA(*Ot*Bu)-OBzl (**52**)

Zu einer Lösung von 3.3 g (10 mmol) H-Glu(OBzl)-*Ot*Bu (**53**) in 55 mL DMF wurden 5.9 mL (40 mmol) *tert*-Butylbromacetat (**54**) und 8.6 mL (50 mmol) DIPEA gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei 55°C unter Argonatmosphäre gerührt. Nach dem Abkühlen wurden die flüchtigen Bestandteile i. Vak. entfernt, und der Rückstand in wenig Cyclohexan/Ethylacetat (1:2) aufgenommen. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Cyclohexan/Ethylacetat (3:1) gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt. Es wurde ein hellgelbes Öl erhalten.

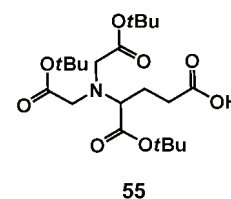


Ausbeute: 3.53 g (6.7 mmol; 67%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>8</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 521.6 g/mol): *m/z*: 522.3 [M<sup>+</sup>], 544.2

#### VII.1.2 Glu-NTA(*Ot*Bu) (**55**)

Zu einer Lösung von 3.4 g (6.6 mmol) **52** in 100 mL Methanol wurden drei Spatelspitzen Pd/C (10%) gegeben. Der Reaktionskolben wurde mehrfach evakuiert und mit N<sub>2</sub> geflutet. Nach dem letzten Evakuieren wurde mit H<sub>2</sub> geflutet und für etwa 5 h bei Raumtemperatur unter intensivem Rühren hydriert. Sobald kein Wasserstoffverbrauch mehr festzustellen war, wurde vom Katalysator abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Produkt als gelbliches Öl erhalten.

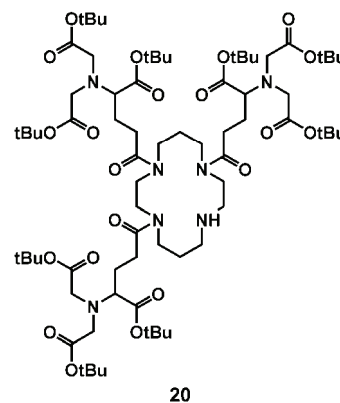


Ausbeute: 2.85 g (6.6 mmol; 99%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>8</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 431.5 g/mol): *m/z*: 432.2 [M<sup>+</sup>], 454.2

### VII.1.3 *tris*NTA(OtBu) (**20**)

2.9 g (6.6 mmol) **55** wurden in 150 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, und anschließend wurden 440 mg (2.2 mmol) 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan (**56**), 2.8 g (8.8 mmol) TBTU und 2.0 mL (11.7 mmol) DIPEA zugegeben. Nach Rühren über Nacht unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, und der Rückstand in 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit 70 mL Milli-Q-Wasser gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das ölige Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel; Ethylacetat/Ethanol 9:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten.

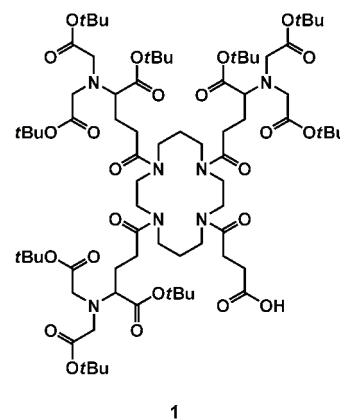


Ausbeute: 2.15 g (1.5 mmol; 68%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>73</sub>H<sub>129</sub>N<sub>7</sub>O<sub>21</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 1440.8 g/mol): *m/z*: 1440.2 [M], 1462.0

### VII.1.4 Carboxy-*tris*NTA(OtBu) (**1**)

Zu einer Lösung von 1.0 g (0.7 mmol) **20** in 25 mL CHCl<sub>3</sub> wurden 210 mg (2.1 mmol) Bernsteinsäureanhydrid (**57**) und 490 μL (3.5 mmol) TEA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde ca. 18 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand in 50 mL CHCl<sub>3</sub> aufgenommen und dreimal mit Milli-Q-Wasser gewaschen. Anschließend wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt



wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (100% Ethylacetat, dann 50% Ethylacetat/Methanol) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten

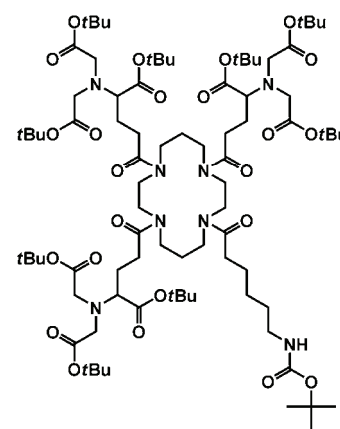
Ausbeute: 0.8 g (0.52 mmol; 52%)

Anschließend erfolgte eine weitere Reinigung mittels RP-HPLC mit einer präparativen C<sub>18</sub>-Säule (Vydac® 218TP, Grace). Als Laufmittel A wurde Acetonitril/Milli-Q-Wasser 60:40 gewählt, als Laufmittel B reines Acetonitril. Das Produkt wurde mit einem Stufengradienten (0-4 min: 0% B, 4.1-22 min: 18-100% B, 22-27 min: 100% B) bei einer Flussrate von 20 mL/min eluiert. Nach dem Gefriertrocknen wurde ein weißer Feststoff erhalten.

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>77</sub>H<sub>133</sub>N<sub>7</sub>O<sub>24</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 1540.9 g/mol): *m/z*: 1541.0 [M<sup>+</sup>], 1562.2

### VII.1.5 Boc-ε-Aminocapronsäure-trisNTA(OtBu) (58)

1.3 g (0.9 mmol) **20** wurden in 30 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und mit 207 mg (0.9 mmol) Boc-ε-Aminocapronsäure (**59**) versetzt. Zu der Mischung wurden 450 mg (1.4 mmol) TBTU und 330 μL (1.9 mmol) DIPEA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter Argonatmosphäre über Nacht gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 30 mL Milli-Q-Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet.



Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat) gereinigt. Man erhält das Produkt als gelbliches Öl.

Ausbeute: 0.94 g (0.57 mmol; 82%)

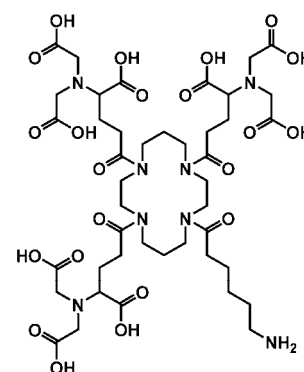
ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>84</sub>H<sub>148</sub>N<sub>8</sub>O<sub>24</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 1654.1 g/mol): *m/z*: 1653.2 [M], 1675.0

### VII.1.6 Aminocaprionsäure-*tris*NTA (11)

1.1 g (0.7 mmol) **58** wurden zusammen mit 600 mg (6.4 mmol) Phenol, 600  $\mu$ L (2.9 mmol) TIPS, 1 mL (7.1 mmol) EDT und 600  $\mu$ L Milli-Q-Wasser in 50 mL TFA gelöst. Die Reaktionsmischung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt, und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile bis fast zur Trockene i. Vak. entfernt. Zum Rückstand wurde kalter Diethylether gegeben, wodurch das Produkt als weißer Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen, in Milli-Q-Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Man erhielt das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 0.63 g (0.6 mmol; 85%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>43</sub>H<sub>68</sub>N<sub>8</sub>O<sub>22</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 1049.0 g/mol): *m/z*: 1048.4 [M]



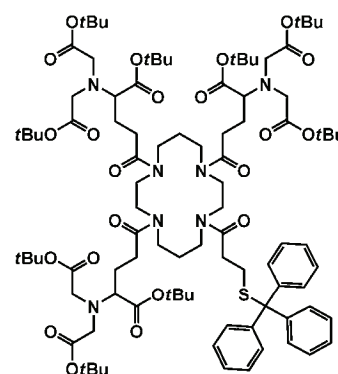
11

### VII.1.7 Trt-Sulfanylpropionsäure-*tris*NTA(*Ot*Bu) (22)

200 mg (0.13 mmol) **20** wurden mit 48.4 mg (0.13 mmol) Trt-Sulfanylpropionsäure (**21**) in 5 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Zu der Lösung wurden 58.4 mg (0.18 mmol) TBTU und 40  $\mu$ L (0.23 mmol) DIPEA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Argonatmosphäre bei 40°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, und der Rückstand in 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 5 mL Milli-Q-Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/Ethanol 9:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 126 mg (0.07 mmol; 55%)

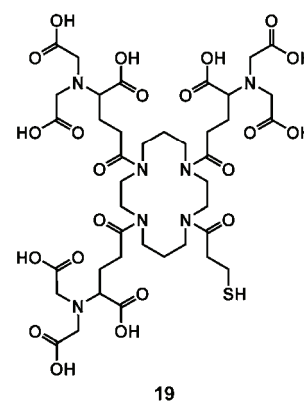
ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>95</sub>H<sub>147</sub>N<sub>7</sub>O<sub>22</sub>S; MW<sub>ber.</sub> = 1771.3 g/mol): *m/z*: 1770.7 [M], 1792.9



22

### VII.1.8 Thio-*tris*NTA (**19**)

400 mg (0.22 mmol) **22** wurden in 2 mL Abspaltungslösung mit EDT (IV.2.25) für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile i. Vak. entfernt und der Rückstand in wenig TFA wieder aufgenommen. Das Produkt wurde mit kaltem Diethylether auf Eis ausgefällt, abzentrifugiert und dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Nach dem Gefriertrocknen wurde ein gelblicher Feststoff erhalten.

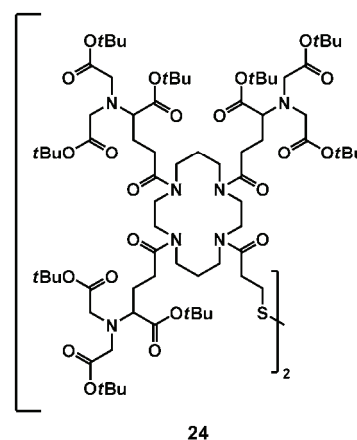


Ausbeute: 154 mg (0.15 mmol; 68%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>7</sub>O<sub>22</sub>S; MW<sub>ber.</sub> = 1024.0 g/mol): *m/z*: 1024.2 [M], 1780.5

### VII.1.9 Dithiopropionsäure-*tris*NTA(*Ot*Bu) (**24**)

700 mg (0.50 mmol) **20** wurden mit 37 mg (0.18 mmol) 3,3'-Dithiopropionsäure (**23**) in 30 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Zu der Lösung wurden 200 mg (0.60 mmol) TBTU und 58 μL (0.60 mmol) DIPEA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 60 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen, und die organische Phase dreimal mit je 20 mL Milli-Q-Wasser ausgeschüttelt. Dann wurde das Lösungsmittel über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat/Ethanol 9:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten.

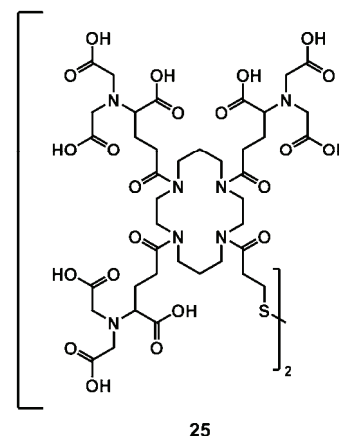


Ausbeute: 450 mg (0.15 mmol; 30%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>152</sub>H<sub>264</sub>N<sub>14</sub>O<sub>44</sub>S<sub>2</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 3055.9 g/mol): *m/z*: 3056.2 [M<sup>+</sup>]

### VII.1.10 Dithiopropionsäure-*tris*NTA (**25**)

0.33 g (0.10 mmol) **24** wurden in 3 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Zu der Lösung wurden 0.58 mL (3.63 mmol) TIPS, 0.15 g (1.59 mmol) Phenol und 5 mL TFA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile i. Vak. komplett entfernt, und der Rückstand in wenig TFA wieder aufgenommen. Das Produkt wurde mit kaltem Diethylether auf Eis ausgefällt, abzentrifugiert

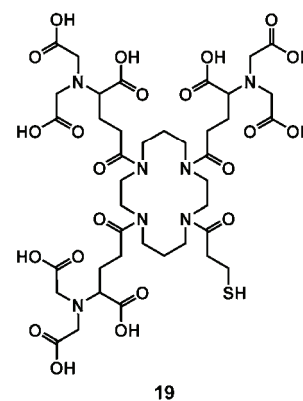


und dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Die Reinigung erfolgte nach dem Trocknen mittels RP-HPLC mit einer C<sub>18</sub>-Säule (Vydac® 218TP, Grace). Es wurde ein 17 minütiger, linearer Gradient von 0-19% Acetonitril in Milli-Q-Wasser mit jeweils 0.2% TFA benutzt.

MALDI<sup>+</sup>-MS (C<sub>80</sub>H<sub>120</sub>N<sub>14</sub>O<sub>44</sub>S<sub>2</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 2046.0 g/mol); *m/z*: 2046.1 [M]

### VII.1.11 Thio-*tris*NTA (**19**)

150 mg (0.07 mmol) **25** wurden mit 15 äq. (280 mg, 1.10 mmol) TCEP in 1 mL Acetatpuffer pH 5.0 gelöst. Die Mischung wurde über Nacht bei 40°C unter schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Reinigung mittels RP-HPLC mit einer C<sub>18</sub>-Säule (Vydac® 218TP, Grace) und einem linearen Gradienten (20 min) von 0-19% Acetonitril in Milli-Q-Wasser mit jeweils 0.2% TFA.



MALDI<sup>+</sup>-MS (C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>7</sub>O<sub>22</sub>S; MW<sub>ber.</sub> = 1024.0 g/mol); *m/z*: 1024.2 [M]

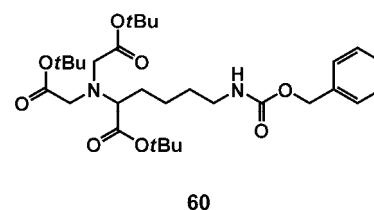


## VII.2 Synthese von *tetrakis*NTA (12)

Das *tetrakis*NTA (12) und sämtliche Vorstufen (60, 62, 63, 65-67) wurden wie von LATA et al. beschrieben synthetisiert.<sup>94,188</sup>

### VII.2.1 Z-Lys-NTA(OrBu) (60)

Zu einer Lösung von 5 g (13 mmol) H-Lys(Z)-OrBu·HCl (61) in 125 mL DMF wurden 7.95 mL (54 mmol) 54 und 11.5 mL (68 mmol) DIPEA gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei 55°C



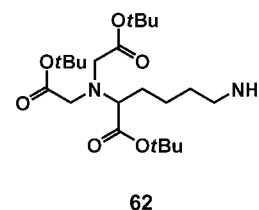
unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile i. Vak. entfernt, und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Das Filtrat wurde i. Vak. entfernt, der Rückstand wurde in Ethylacetat mit wenig Cyclohexan aufgenommen und säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 5.3 g (9.4 mmol; 72%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 564.7 g/mol): *m/z*: 565.5 [M<sup>+</sup>], 587.1

### VII.2.2 Lys-NTA(OrBu) (62)

2 g (3.5 mmol) 60 wurden in 150 mL Methanol gelöst und mit vier Spatelspitzen Pd/C (10%) versetzt. Der Reaktionskolben wurde mehrfach evakuiert und mit N<sub>2</sub> geflutet. Nach dem letzten Evakuieren wurde mit H<sub>2</sub> geflutet



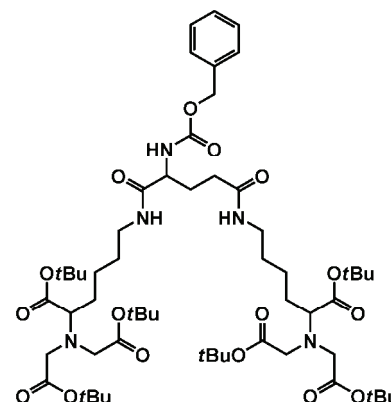
und für etwa 5 h bei Raumtemperatur unter intensivem Rühren hydriert. Sobald kein Wasserstoffverbrauch mehr festzustellen war, wurde vom Katalysator abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Produkt als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 1.5 g (3.4 mmol; 97%)

MALDI<sup>+</sup>-MS (C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 430.6 g/mol): *m/z*: 432.5 [M<sup>2+</sup>], 454.6

### VII.2.3 Z-bisNTA(OtBu) (63)

Zu einer Lösung von 890 mg (2.1 mmol) **62** in 40 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurden nacheinander 270 mg (1.0 mmol) Z-Glu-OH (**64**), 1.22 g (3.8 mmol) TBTU und 0.57 mL (3.3 mmol) DIPEA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in 70 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 20 mL Milli-Q-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. eingengt. Der ölige Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3) gereinigt.



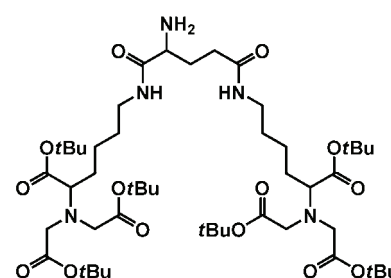
63

Ausbeute: 0.40 g (0.36 mmol; 38%)

MALDI<sup>+</sup>-MS (C<sub>49</sub>H<sub>89</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 1106.4 g/mol): *m/z*: 1128.0 [M+Na]

### VII.2.4 bisNTA(OtBu) (65)

500 mg (0.45 mmol) **63** wurden in 40 mL Methanol gelöst, und zwei Spatelspitzen Pd/C (10%) wurden zugegeben. Der Reaktionskolben wurde mehrfach evakuiert und mit N<sub>2</sub> geflutet. Nach dem letzten Evakuieren wurde mit H<sub>2</sub> geflutet und für etwa 5 h bei Raumtemperatur unter intensivem Rühren hydriert. Sobald kein Wasserstoffverbrauch mehr festzustellen war, wurde vom Katalysator abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Produkt als gelbliches Öl erhalten.



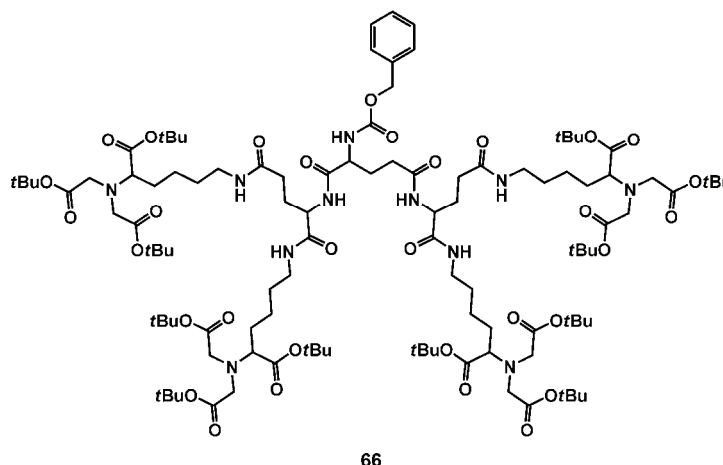
65

Ausbeute: 0.36 g (0.42 mmol; 92%)

MALDI<sup>+</sup>-MS (C<sub>49</sub>H<sub>89</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 972.3 g/mol): *m/z*: 994.9 [M+Na]

### VII.2.5 *Z-tetrakis*NTA(*OtBu*) (66)

Zu einer Lösung von 210 mg (0.22 mmol) **65** in 10 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurden 30 mg (0.10 mmol) **64**, 130 mg (0.40 mmol) TBTU und 60 µL (0.35 mmol) DIPEA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter



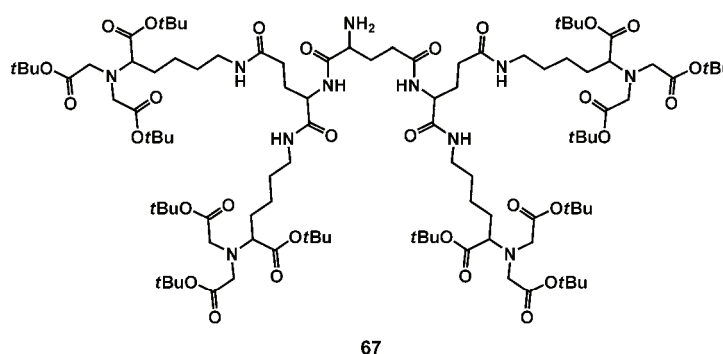
Argonatmosphäre bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, und der Rückstand in 30 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 10 mL Milli-Q-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. eingengt. Der ölige Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3) gereinigt und das Produkt als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 0.12 g (0.05 mmol; 53%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>111</sub>H<sub>189</sub>N<sub>11</sub>O<sub>32</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 2189.7 g/mol): *m/z*: 2189.5 [M]

### VII.2.6 *tetrakis*NTA(*OtBu*) (67)

0.12 g (0.05 mmol) **66** wurden in 15 mL Methanol gelöst, und zwei Spatelspitzen Pd/C (10%) wurden zugegeben. Der Reaktionskolben wurde mehrfach evakuiert und



mit N<sub>2</sub> geflutet. Nach dem letzten Evakuieren wurde mit H<sub>2</sub> geflutet und für etwa 5 h bei Raumtemperatur unter intensivem Rühren hydriert. Sobald kein Wasserstoffverbrauch mehr festzustellen war, wurde vom Katalysator abfiltriert und mit

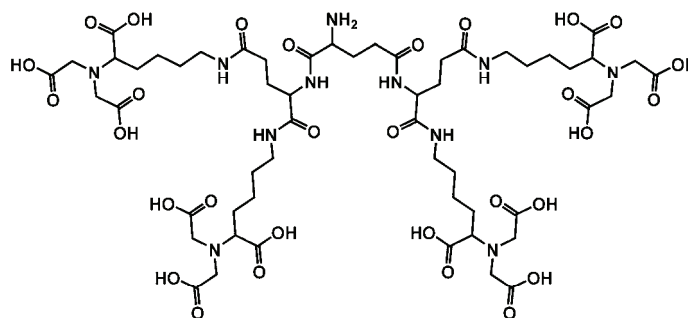
Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Produkt als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 0.10 g (0.05 mmol; 99%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>103</sub>H<sub>183</sub>N<sub>11</sub>O<sub>30</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 2055.6 g/mol): *m/z*: 2055.3 [M], 2076.4

### VII.2.7 tetrakisNTA (12)

750 mg (0.4 mmol) **67** wurden zusammen mit 375 mg (4.0 mmol) Phenol, 375 μL (1.8 mmol) TIPS und 375 μL Milli-Q-Wasser in 30 mL TFA gelöst. Die Reaktionsmischung wurde für



4 h bei Raumtemperatur gerührt, und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile bis fast zur Trockene i. Vak. entfernt. Zu dem Rückstand wurde kalter Diethylether gegeben, wodurch das Produkt als weißer Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abzentrifugiert, dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen, in Milli-Q-Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Man erhielt das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 484 mg (0.35 mmol; 88%)

MALDI<sup>+</sup>-MS (C<sub>55</sub>H<sub>87</sub>N<sub>11</sub>O<sub>30</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 1382.3 g/mol): *m/z*: 1384.6 [M<sup>+</sup>]

### VII.3 Synthese der rigiden *bis*NTA-Chelatorköpfe

Es wurde eine Syntheseroute ausgewählt, die für die verwendeten rigiden *bis*NTAs **28** und **29** bis auf das Ausgangsmaterial völlig gleich war. Zum Einführen der NTA-Gruppen wurde hierbei das aus der *tris*NTA-Synthese bekannte Glu-NTA(*Or*Bu) (**55**, 0) verwendet.

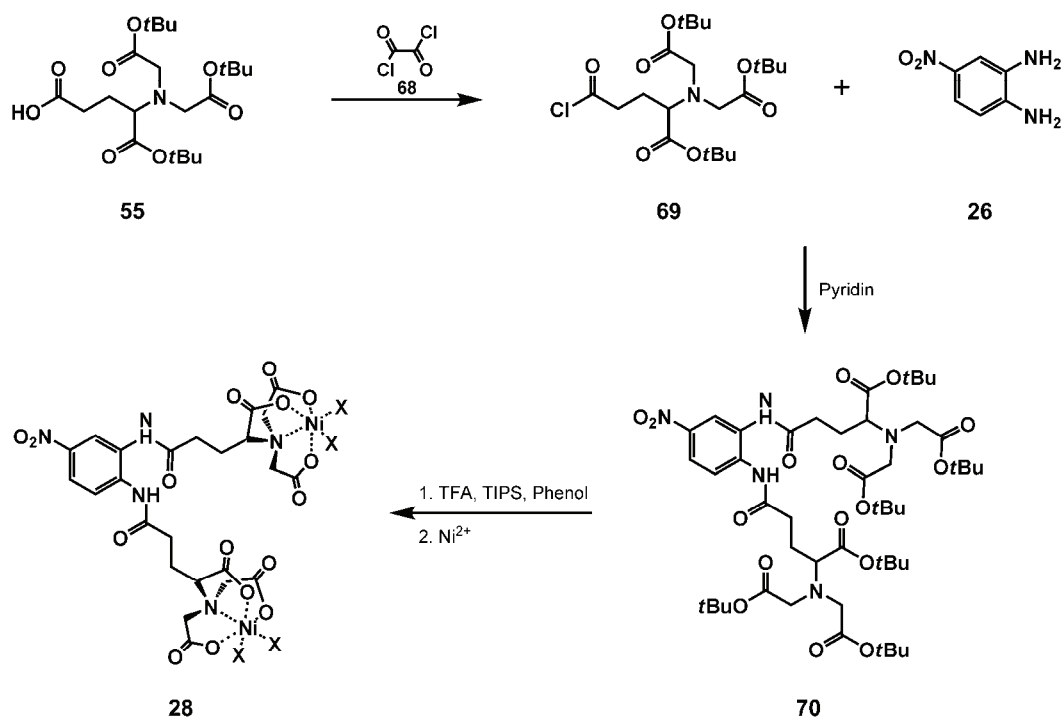
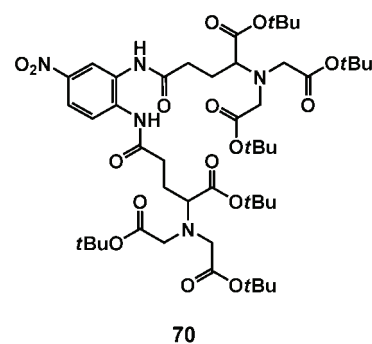


Abb. 1: Syntheseroute für das Nitrophenyl-*ortho*-*bis*NTA (**28**).

#### VII.3.1 Nitrophenyl-*ortho*-*bis*NTA(*Or*Bu) (**70**)

1.5 g (3.5 mmol) **55** wurden in 50 mL trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und auf Eis abgekühlt. Zu der kalten Lösung wurden 0.9 mL (10.4 mmol) Oxalylchlorid (**68**) in wenig DMF gelöst zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde nach Erwärmen auf Raumtemperatur 30 min gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel schnell bei niedriger Temperatur i.



Vak. entfernt und der Rückstand in 10 mL trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen. Das gelöste Säurechlorid (**69**) wurde zu einer Lösung aus 214 mg (1.4 mmol) 2-Nitro-*o*-phenyldiamin (**26**) mit 0.4 mL (4.2 mmol) Pyridin in 50 mL Toluol langsam zugetropft.

Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/ Ethylacetat 2:1) gereinigt und das Produkt als orangenes Öl erhalten.

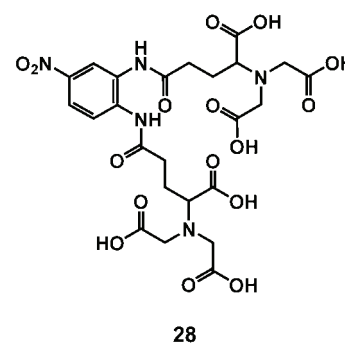
Ausbeute: 1.3 g (1.15 mmol; 82%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>48</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 980.2 g/mol): *m/z*: 980.7 [M]

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1.38 (m, 54H, CH<sub>3</sub>), 1.99 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.59 (m, 4H, NHCOCH<sub>2</sub>), 3.35 (m, 10H, CHN), 6.64 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 7.85 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 8.13 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH).

### VII.3.2 Nitrophenyl-ortho-bisNTA (28)

220 mg (0.22 mmol) **70**, 50 mg (0.53 mmol) Phenol und 50 μL (0.31 mmol) TIPS wurden in 50 mL TFA und einem Tropfen Milli-Q-Wasser gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile i. Vak. bis fast zur Trockene entfernt. Das Produkt wurde mit kaltem Diethylether ausgefällt, abfiltriert und mit



Diethylether gewaschen. Der Feststoff wurde in so wenig Ammoniak wie möglich gelöst und gefriergetrocknet. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff erhalten.

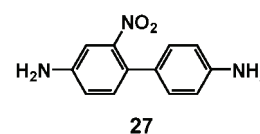
Ausbeute: 152 mg (0.21 mmol; 97%)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 643.2 g/mol): *m/z*: 642.2 [M]

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 2.14 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CHN), 2.76 (m, 4H, NHCOCH<sub>2</sub>), 3.75 (m, 10H, CH<sub>2</sub>COO & CHN), 7.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.06 (dd, *J* = 2.8 Hz, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.28 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, ArH).

### VII.3.3 2-Nitrobenzidin (27)

1 g (5.4 mmol) Benzidin (71) wurden in 10 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelöst. 0.55 g (5.4 mmol) KNO<sub>3</sub> wurden innerhalb von 30 min zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei



Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 200 g Eis gegossen. Die Mischung wurde erhitzt bis sie klar war und dann erneut schnell abgekühlt. Der Niederschlag wurde isoliert, mit 28%-iger Ammoniaklösung und Wasser gewaschen und aus Milli-Q-Wasser/Ethanol umkristallisiert. Das Produkt wurde als rot-brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.9 g (3.9 mmol; 73%)

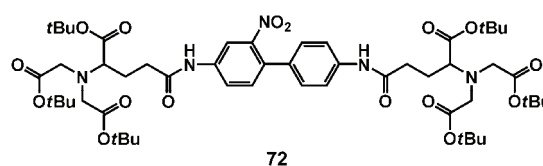
ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 229.2 g/mol): *m/z*: 230.0 [M<sup>+</sup>]

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.76 (s, 2H, NH), 3.95 (s, 2H, NH), 6.72 (m, 2H, ArH), 6.86 (dd, *J* = 8.2 Hz; *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.09 (m, 3H, ArH), 7.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH).

<sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 76.5, 77.0, 77.5, 109.6, 115.2, 118.4, 126.0, 127.6, 129.0, 132.6, 145.7, 146.0.

### VII.3.4 Nitrobenzidin-*bis*NTA(*Ot*Bu) (72)

1.5 g (3.5 mmol) **55** wurden in 50 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf Eis abgekühlt. Zu der kalten Lösung wurden 0.9 mL (10.4 mmol) **68** in wenig DMF



gelöst zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde nach Erwärmen auf Raumtemperatur 30 min gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel schnell bei niedriger Temperatur i. Vak. entfernt, und der Rückstand wurde in 10 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Das gelöste **69** wurde zu einer Lösung aus 320 mg (1.4 mmol) **27** mit 0.4 mL (4.2 mmol) Pyridin in 50 mL Toluol langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1) gereinigt und das Produkt als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1.40 g (1.33 mmol; 95%)

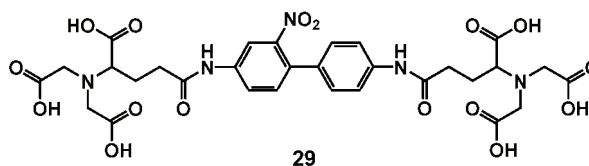
ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>54</sub>H<sub>81</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 1055.6 g/mol): *m/z*: 1056.5 [M<sup>+</sup>]

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1.43-1.44 (m, 54H, CH<sub>3</sub>), 1.89-2.22 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.52-2.76 (m, 4H, NHCOCH<sub>2</sub>), 3.27-3.34 (m, 3H, CHN), 3.43 (m, 8H, CH<sub>2</sub>COO), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.91 (dd, *J* = 2.2 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 8.14 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, ArH), 9.07 (s, 1H, NHCO), 9.52 (s, 1H, NHCO).

<sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 26.4, 26.7, 28.1, 28.2, 34.0, 34.2, 54.4, 54.6, 64.9, 65.0, 81.3, 81.5, 81.7, 114.8, 119.8, 122.9, 128.3, 130.2, 131.9, 132.3, 138.6, 138.8, 149.1, 171.1, 171.3, 171.6, 172.0, 172.5.

### VII.3.5 Nitrobenzidin-*bis*NTA (29)

232 mg (0.22 mmol) **72**, 50 mg (0.53 mmol) Phenol und 50 μL (0.31 mmol) TIPS wurden in 50 mL TFA und einem Tropfen Milli-Q-



Wasser gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile i. Vak. bis fast zur Trockene entfernt. Das Produkt wurde mit kaltem Diethylether ausgefällt, abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Der Feststoff wurde in so wenig Ammoniak wie möglich gelöst und gefriergetrocknet. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 151 mg (0.21 mmol, 93 %)

ESI<sup>+</sup>-MS (C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>; MW<sub>ber.</sub> = 719.2 g/mol): *m/z*: 718.1 [M]

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 2.03 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.59 (m, 4H, NHCOCH<sub>2</sub>), 3.63 (m, 10H, CH<sub>2</sub>COO & CHNCO), 7.09 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.92 (s, 1H, ArH).

<sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 21.9, 22.2, 33.5, 55.2, 55.3, 66.9, 67.0, 115.9, 121.2, 124.4, 128.5, 130.7, 132.3, 133.2, 137.1, 137.4, 147.9, 170.9, 172.8, 172.9.



## VIII LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN

### VIII.1 Puffer und Lösungen

Sämtliche Puffer wurden mit Milli-Q-Wasser angesetzt und vor Gebrauch entgast und sterilfiltriert.

#### VIII.1.1 Allgemein verwendete Puffer

*HBS-Puffer:* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl

*Ammoniumacetat-Puffer:* 20 mM Ammoniumacetat, pH 5.0

#### VIII.1.2 Zellkultur

100 mg/mL *Ampicillin*

1 mM *IPTG*

*LB-Medium:* 10 g Pepton/L  
5 g Hefeextrakt/L  
10 g NaCl/L

Das Medium wird 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

#### VIII.1.3 Chromatographien

##### VIII.1.3.1 Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie

*Nickellösung:* 100 mM NiSO<sub>4</sub>

*Aufschlusspuffer:* 20 mM Hepes, pH 8.0  
300 mM NaCl

Reinigung des  $\alpha$ N- oder  $\beta$ C-His<sub>6</sub> Proteasoms:

*Laufpuffer (A):* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl

20 mM Imidazol  
*Elutionspuffer (B):* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl  
500 mM Imidazol

Reinigung von MBP-H<sub>6/10</sub>:

*Laufpuffer (A):* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl  
*Elutionspuffer (B):* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl  
1 M Imidazol

### VIII.1.3.2 Größenausschlusschromatographie

*HBS-Puffer*

*HBS + Imidazol:* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl  
50-100 mM Imidazol

### VIII.1.3.3 Anionenaustauschchromatographie

*Laufpuffer:* 10 mM Hepes, pH 7.0  
*Elutionspuffer:* 10 mM Hepes, pH 7.0  
1 M NaCl

### VIII.1.3.4 Reversed-phase HPLC

*Laufmittel A:* Milli-Q-Wasser mit 0.2% TFA  
*Laufmittel B:* Acetonitril mit 0.2% TFA  
*Laufmittel A2:* Milli-Q-Wasser /Acetonitril 60:40  
*Laufmittel B2:* Acetonitril

**VIII.1.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

<i>Acrylamid-Lösung 30%:</i>	Acrylamid/Bisacrylamid	42:1
<i>Acrylamid-Lösung 20%:</i>	Acrylamid/Bisacrylamid	4:1
<i>Trenngelpuffer (4-fach):</i>	352 mM Tris, pH 8.0 320 mM Borsäure 20% Saccharose 400 $\mu$ M EDTA	
<i>Sammelgelpuffer (4-fach):</i>	400 mM Tris, pH 6.8 10% Saccharose	
<i>Probenpuffer (4-fach):</i>	Sammelgelpuffer mit 7% Glycerin eine Spatelspitze Bromphenolblau	
<i>TBE-Puffer:</i>	88 mM Tris, pH 8.0 80 mM Borsäure 100 $\mu$ M EDTA	

**VIII.1.4.1 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen**

<i>Coomassie-Färbelösung:</i>	0.25% Coomassie R Brilliant Blau G 250 10% Essigsäure 40% Methanol
<i>Entfärbelösung:</i>	10% Essigsäure 40% Methanol

**VIII.1.4.2 Peptidaseaktivität im Nativgel**

<i>Tris-Puffer:</i>	30 mM Tris, pH 7.8 5 mM $MgCl_2$ 10 mM KCl direkt vor Gebrauch wird zugegeben: 0.5 mM DTT 2 mM ATP 100 $\mu$ M Suc-LLVT-AMC
<i>Peptidlösung:</i>	10 mM Suc-LLVT-AMC in DMF

## VIII.1.5 Festphasenkupplung

### VIII.1.5.1 Abspaltungslösungen

<i>Ohne EDT:</i>	96.25% TFA	<i>mit EDT:</i>	95% TFA
	1.25% Phenol		1.25% Phenol
	1.25% TIPS		1.25% TIPS
	1.25% Milli-Q-Wasser		1.25% Milli-Q-Wasser
			1.25% EDT

### VIII.1.5.2 Chloranil-Test

1. 2% Acetaldehyd in DMF
2. 2% Chloranil in DMF

### VIII.1.5.3 Kaiser-Test

1. 80% Phenol in Ethanol (Fluka)
2. 2% 1 mM KCN in Pyridin (Fluka)
3. 6% Ninhydrin in Ethanol (Fluka)

## VIII.1.6 Fluoreszenzspektroskopie

<i>HBST-Puffer:</i>	20 mM Hepes, pH 7.5
	150 mM NaCl
	0.01% Tween20

## VIII.1.7 Fluoreszenzmikroskopie

<i>HBSE-Puffer:</i>	20 mM Hepes, pH 7.5
	150 mM NaCl, 50 $\mu$ M EDTA
<i>Oberflächenaktivierung:</i>	1 M Imidazol
	5 mM Imidazol
	100 mM EDTA
	10 mM NiSO <sub>4</sub>

*HBS-Ca-Puffer:* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>

### VIII.1.8 Oberflächenplasmonresonanz

*HBSET-Puffer:* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl, 50 µM EDTA  
0.05% Tween20

*Boratpuffer:* 100 mM Natriumborat, pH 8.5 (GE Healthcare)

*Citratpuffer:* 0.1 M Natriumcitrat, pH 2.0

*Acetatpuffer:* 100 mM Natriumacetat, pH 4.0 (GE Healthcare)  
1 M NaCl

*Lösungen für Peptidkupplung:* 0.4 M EDC  
0.1 M NHS  
80 mM PDEA in Boratpuffer  
50-200 µM PAtrisNTA in Citratpuffer  
50 mM Cystein in Acetatpuffer

*Oberflächenaktivierung:* 1 M Imidazol  
100 mM EDTA  
10 mM NiSO<sub>4</sub>

### VIII.1.9 Präparation einer His<sub>6</sub>-Säule

*Tris-Puffer:* 50 mM Tris, pH 7.5  
5 mM EDTA

*Abfanglösung:* 50 mM Cystein in Tris-Puffer

*Waschlösung:* 1 M NaCl

*HBSE:* 20 mM Hepes, pH 7.5  
150 mM NaCl  
50 mM EDTA

## VIII.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan	Fluka
2-Nitro- <i>o</i> -phenyldiamin	Aldrich®
3,3'-Dithiopropionsäure	Fluka
Aceton	Fluka
Acetonitril	Fisher Scientific
Acetonitril, HPLC gradient grade	AcrosOrganics
Acrylamid	Carl Roth®
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 30%	Carl Roth®
Rotiphorese Gel 30	
Ammoniaklösung 28%-ig	Carl Roth®
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin	Sigma
ATP	Sigma
ATTO565-Maleimid	ATTO-Tec
<i>Micro BCA™ assay kit</i>	PIERCE
Benzidin	Fluka
Bernsteinsäureanhydrid	Merck
Bisacrylamid	Carl Roth®
Boc- $\epsilon$ -Aminocapronsäure	Fluka
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Carl Roth®
Chloroform	AcrosOrganics
Coomassie Brilliant Blau G 250	Carl Roth®
Cyclohexan	AcrosOrganics
Cystein	Sigma
DAPEG	Rapp Polymere
Dichlormethan, abs.	Fluka
Diethylether	Fisher Scientific
DIPEA	Fluka
DMF	Merck
DMF, abs.	Fluka
DMSO, abs.	Fluka
DTT	Fermentas
EDC	Fluka
EDT	Fluka
EDTA	Carl Roth®
Essigsäure	Fisher Scientific
Ethanol	Carl Roth®
Ethylacetat	AcrosOrganics
Fluoreszein-markiertes Casein	Molecular Probes®
Glycerin	Carl Roth®

---

GOPTS	Fluka
Hefeextrakt	Carl Roth®
Hepes	Carl Roth®
H-Glu(Obzl)-OtBu	Bachem
H-Lys(Z)-OtBu·HCl	Bachem
HOBt	Alfa Aesar
Imidazol	Merck
IPTG	Fermentas
KAISER-Test	Fluka
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumnitrat	Carl Roth®
Kieselgel 60	Carl Roth®
konz. Schwefelsäure	Merck
<i>LI Silver</i>	Nanoprobes
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Fisher Scientific
Natriumchlorid	VWR
Natriumcitrat	Carl Roth®
NHS	Aldrich®
Nickel(II)sulfat Hexahydrat	Carl Roth®
OregonGreen488-Maleimid	Molecular Probes®
Oxalychlorid	AcrosOrganics
Pd/C	Aldrich®
PDEA	GE Healthcare
Pepton	Carl Roth®
Phenol	Fluka
Pyridin	AcrosOrganics
Saccharose	Carl Roth®
SDS	Carl Roth®
Suc-LLVY-AMC	Bachem
<i>SulfoLink® Coupling Gel</i>	PIERCE
TBTU	Fluka
TCEP	Fluka
TEA	Fluka
TEMED	Carl Roth®
<i>tert</i> -Butylbromacetat	Aldrich®
TIPS	Fluka
Toluol	Merck
Trifluoressigsäure	Carl Roth®
Tris	Carl Roth®
Tris	Carl Roth®
Trt-Sulfanylpropionsäure	Bachem
Tween20 10%-ig	Fluka
Z-Glu-OH	Bachem

---

## IX GERÄTE & VERBRAUCHSMATERIALIEN

Geräte & Verbrauchsmaterialien	Hersteller
200 W Hg(Xe) Bogenlampe	Newport Spectra-Physics
24- <i>well</i> Platte	greiner bio-one
96- <i>well</i> Platte	greiner bio-one
ÄKTAexplorer 100 System	GE Healthcare
ÄKTAprime System	GE Healthcare
Amicon Ultra-15 Konzentratoren	Millipore
Beckmann L70 <i>Ultracentrifuge</i>	Beckmann Coulter
BIAcore T100	GE Healthcare
Branson <i>sonifier</i> 250	Branson
Cary 50 Bio UV Vis Spektrophotometer	Varian
Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer	Varian
<i>centrifuge</i> 5415R	Eppendorf
CM120 Transmissionselektronenmikroskop	Phillips
CM5 Sensorchip	GE Healthcare
Eppendorf-Reaktionsgefäße	greiner bio-one
Ettan <sup>TM</sup> LC System	GE Healthcare
Filter, steril	Millipore
Filterpapier	Whatman®
Fluorolog-III	Horiba
Handschuhe, Nitril oder Latex	Carl Roth®
HPLC Systeme	Jasco
Konzentratoren, Amicon	Millipore
Küvetten, Quarzglas	Hellma
LSM 510	Carl Zeiss
Lumi Imager F1 <sup>TM</sup>	Roche
Magnetrührer	IKA®
Mettler PM 460 Waage	Mettler
Mikroliter Spritzen	Hamilton
Mikroskopiedeckgläser	Menzel
Milli-Q-Plus Wasser System	Millipore
Multifuge 1S-R	Haraeus
native PAGE System	Eigenbau
Pasteurpipetten	Carl Roth®
pH-Meter	WTW
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen	greiner bio-one
Plastikspritzen	Braun
Quantifoil®-Grid	Quantifoil Micro Tools
Reaktionsgefäße, 15 und 50 ml	greiner bio-one
Roti®-Spin mini, MWCO: 3 kDa	Carl Roth®
SMART <i>Chromatography System</i>	GE Healthcare



Sorvall RC 3C Plus	Sorvall
<i>Spectrophotometer</i> ND-1000, Nanodrop	PEQlab
Thermomixer	Eppendorf
UV Lampe NU-8 KL	Benda
Vitrobot™	FEI
Vortexer	Bender & Hobein AG

### Säulen

Säule	Hersteller
HiTrap™ Chelating HP, 1 mL	GE Healthcare
HiTrap™ Chelating HP, 5 mL	GE Healthcare
HiTrap™ Q HP, 1 mL	GE Healthcare
Superose™ 6 10/300 GL	GE Healthcare
Superose™ 6 PC 3.2/30	GE Healthcare
Superdex™ 200 PC 3.2/30	GE Healthcare
Superdex™ 75 HiLoad™ 16/60	GE Healthcare
Vydac® 218TP54	Grace
Vydac® 218TP510	Grace
Vydac® 218TP1022	Grace

**X VERWENDETE ABKÜRZUNGEN**

ACP	Acyl-Carrier-Protein
AcpS	ACP-Synthetase
AFP	Autofluoreszentes Protein, <i>auto fluorescent protein</i>
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Anp	3-Amino-3-(2-nitrophenyl)propionsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATTO	ATTO565
BCA	Bicinchoninsäure, <i>bicinchonic acid</i>
BCCP	Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein
BG	O <sup>6</sup> -Benzylguanin
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
Bzl	Benzyl
CALI	Chromophor-unterstützte-Licht-Inaktivierung, <i>chromophor assisted light inactivation</i>
CLSM	konfokale Laser-Rastermikroskopie, <i>confocal laser scanning microscopy</i>
CoA	Coenzym A
CV	Säulenvolumen, <i>column volume</i>
Da	Dalton
DAPEG	Diaminopolyethylenglykol
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTP	Dithiopropionsäure
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDT	Ethandithiol
EDT	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
EPL	Intein-vermittelte Proteinverknüpfung, <i>expressed protein ligation</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fl	Fluoreszein
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gravitationskonstante
GFP	grünfluoreszierendes Protein, <i>green fluorescent protein</i>
Glu	Glutaminsäure
GOPTS	(3-Glycidylxypropyl)-trimethoxysilan
h	Stunde, <i>hour</i>
hAGT	humane O <sup>6</sup> -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase

---

HBS	<i>Hepes-buffered saline</i>
Hepes	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
HRV2	<i>human rhinovirus serotype 2</i>
I	Intensität
i. Vak.	im Vakuum
IDA	Iminodiessigsäure, <i>iminodiacetic acid</i>
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie, <i>immobilized metal-chelate affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie, <i>isothermal titration calorimetry</i>
L	Liter
Lys	Lysin
M	mol/L
MALDI	Matrix-unterstützte-Laserdesorptions-Ionisation, <i>Matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MBP	Maltosebindeprotein
MCH	multivalenter Chelatorkopf, <i>multivalent chelator head</i>
MDL	<i>multidrug resistance like</i>
MHC	<i>major histocompatibility</i>
min	Minute
ML	<i>Maximum-Likelihood</i>
Mmt	Monomethoxytrityl
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht, <i>molecular weight</i>
MWCO	<i>molecular weight cutoff</i>
n	Brechungsindex
NBD	Nukleotidbindedomäne
NG	Nanogold®
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NTA	<i>N</i> -Nitrilotriacetat
Nvoc	Nitroveratryl
OEG	Oligoethylenglykol
OG488	OregonGreen488
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PATrisNTA	photoaktivierbares <i>tris</i> NTA
PCP	Peptidyl- <i>Carrier</i> -Protein
Pd/C	10% Palladium/Kohle
PDEA	2-(2-Pyridinyl)dithio)ethanamin-hydrochlorid
PEG	Polyethylenglykol
PP	Polyproline

---

PPII Helix	Polyprolin II Helix
PPT	Phosphopantetheinyl-Transferase
RfS	reflektometrische Interferenzspektroskopie
RP	Umkehrphase, <i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>response unit</i>
SAM	selbstassemblierende Monolage, <i>self assembled monolayer</i>
Sfp	PCP-Synthetase
SOM	<i>Self-organizing map</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
Suc	Succinimidyl
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TC	Tetracystein
TEA	Triethylamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIPS	Triisopropylsilan
TIRF	Interne Totalreflektions Fluoreszenz, <i>total internal reflection fluorescence</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Tryl
U/min	Umdrehungen/min
VLDL	Lipoprotein sehr geringer Dichte, <i>very low-density lipoprotein</i>
$V_R$	Retentionsvolumen
YFP	gelbfluoreszierendes Protein, <i>yellow fluorescent protein</i>
Z	Benzyloxycarbonyl
$\lambda$	Wellenlänge

## XI LITERATUR

1. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M. et al. The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001).
2. Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. & Williams, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 19-50 (1996).
3. Phizicky, E., Bastiaens, P.I., Zhu, H., Snyder, M. & Fields, S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* **422**, 208-215 (2003).
4. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207 (2003).
5. Sali, A., Glaeser, R., Earnest, T. & Baumeister, W. From words to literature in structural proteomics. *Nature* **422**, 216-225 (2003).
6. Piehler, J. New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 4-14 (2005).
7. Gomase, V.S., Kale, K.V., Tagore, S. & Hatture, S.R. Proteomics: technologies for protein analysis. *Curr. Drug. Metab.* **9**, 213-220 (2008).
8. Hahn, M.E. & Muir, T.W. Manipulating proteins with chemistry: a cross-section of chemical biology. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 26-34 (2005).
9. Foley, T.L. & Burkart, M.D. Site-specific protein modification: advances and applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 12-19 (2007).
10. Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y. & Tsien, R.Y. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 906-918 (2002).
11. Miyawaki, A., Sawano, A. & Kogure, T. Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat. Cell. Biol. Suppl.* S1-7 (2003).
12. Giepmans, B.N., Adams, S.R., Ellisman, M.H. & Tsien, R.Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217-224 (2006).
13. Shimomura, O., Johnson, F.H. & Y., S. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, 223-239 (1962).
14. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805 (1994).
15. Tsien, R.Y. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544 (1998).
16. Dobbie, I.M., Lowndes, N.F. & Sullivan, K.F. Autofluorescent proteins. *Methods Cell Biol.* **85**, 1-22 (2008).
17. Shaner, N.C., Steinbach, P.A. & Tsien, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**, 905-909 (2005).
18. Andresen, M., Stiel, A.C., Trowitzsch, S., Weber, G., Eggeling, C., Wahl, M.C., Hell, S.W. & Jakobs, S. Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 13005-13009 (2007).
19. Andresen, M., Stiel, A.C., Folling, J., Wenzel, D., Schonle, A., Egner, A., Eggeling, C., Hell, S.W. & Jakobs, S. Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1035-1040 (2008).
20. Tyagarajan, K., Pretzer, E. & Wiktorowicz, J.E. Thiol-reactive dyes for fluorescence labeling of proteomic samples. *Electrophoresis* **24**, 2348-2358 (2003).

21. Berlier, J.E., Rothe, A., Buller, G., Bradford, J., Gray, D.R., Filanoski, B.J., Telford, W.G., Yue, S., Liu, J., Cheung, C.Y., Chang, W., Hirsch, J.D., Beechem, J.M. & Haugland, R.P. Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 1699-1712 (2003).
22. Johnsson, N. & Johnsson, K. A fusion of disciplines: chemical approaches to exploit fusion proteins for functional genomics. *ChemBioChem* **4**, 803-810 (2003).
23. Gronemeyer, T., Godin, G. & Johnsson, K. Adding value to fusion proteins through covalent labelling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 453-458 (2005).
24. O'Hare, H.M., Johnsson, K. & Gautier, A. Chemical probes shed light on protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 488-494 (2007).
25. Noren, C.J., Wang, J. & Perler, F.B. Dissecting the chemistry of protein splicing and its applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 450-466 (2000).
26. Southworth, M.W., Amaya, K., Evans, T.C., Xu, M.Q. & Perler, F.B. Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the Mycobacterium xenopi gyrase A intein. *Biotechniques* **27**, 110-114, 116, 118-120 (1999).
27. Evans, T.C., Jr., Benner, J. & Xu, M.Q. The in vitro ligation of bacterially expressed proteins using an intein from Methanobacterium thermoautotrophicum. *J. Biol. Chem.* **274**, 3923-3926 (1999).
28. Ludwig, C., Pfeiff, M., Linne, U. & Mootz, H.D. Ligation of a synthetic peptide to the N terminus of a recombinant protein using semisynthetic protein trans-splicing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 5218-5221 (2006).
29. Muir, T.W., Sondhi, D. & Cole, P.A. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6705-6710 (1998).
30. Cotton, G.J. & Muir, T.W. Generation of a dual-labeled fluorescence biosensor for Crk-II phosphorylation using solid-phase expressed protein ligation. *Chem. Biol.* **7**, 253-261 (2000).
31. Southworth, M.W., Adam, E., Panne, D., Byer, R., Kautz, R. & Perler, F.B. Control of protein splicing by intein fragment reassembly. *EMBO J.* **17**, 918-926 (1998).
32. Derbyshire, V., Wood, D.W., Wu, W., Dansereau, J.T., Dalgaard, J.Z. & Belfort, M. Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11466-11471 (1997).
33. Xu, R., Ayers, B., Cowburn, D. & Muir, T.W. Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 388-393 (1999).
34. Wu, H., Hu, Z. & Liu, X.Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of Synechocystis sp. PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9226-9231 (1998).
35. Lew, B.M., Mills, K.V. & Paulus, H. Protein splicing in vitro with a semisynthetic two-component minimal intein. *J. Biol. Chem.* **273**, 15887-15890 (1998).
36. Mills, K.V., Lew, B.M., Jiang, S. & Paulus, H. Protein splicing in trans by purified N- and C-terminal fragments of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3543-3548 (1998).
37. Lockless, S.W. & Muir, T.W. Traceless protein splicing utilizing evolved split inteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 10999-11004 (2009).
38. Evans, T.C., Jr., Benner, J. & Xu, M.Q. Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Sci.* **7**, 2256-2264 (1998).
39. Severinov, K. & Muir, T.W. Expressed protein ligation, a novel method for studying protein-protein interactions in transcription. *J. Biol. Chem.* **273**, 16205-16209 (1998).
40. Goody, R.S., Alexandrov, K. & Engelhard, M. Combining chemical and biological techniques to produce modified proteins. *ChemBioChem* **3**, 399-403 (2002).

41. Muir, T.W. Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 249-289 (2003).
42. Ottesen, J.J., Huse, M., Sekedat, M.D. & Muir, T.W. Semisynthesis of phosphovariants of Smad2 reveals a substrate preference of the activated T beta RI kinase. *Biochemistry* **43**, 5698-5706 (2004).
43. Tolbert, T.J. & Wong, C.H. Conjugation of glycopeptide thioesters to expressed protein fragments: semisynthesis of glycosylated interleukin-2. *Methods Mol. Biol.* **283**, 255-266 (2004).
44. Warren, J.D., Miller, J.S., Keding, S.J. & Danishefsky, S.J. Toward fully synthetic glycoproteins by ultimately convergent routes: a solution to a long-standing problem. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6576-6578 (2004).
45. Romanelli, A., Shekhtman, A., Cowburn, D. & Muir, T.W. Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6397-6402 (2004).
46. Cowburn, D. & Muir, T.W. Segmental isotopic labeling using expressed protein ligation. *Methods Enzymol.* **339**, 41-54 (2001).
47. Pellois, J.P., Hahn, M.E. & Muir, T.W. Simultaneous triggering of protein activity and fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7170-7171 (2004).
48. Scheibner, K.A., Zhang, Z. & Cole, P.A. Merging fluorescence resonance energy transfer and expressed protein ligation to analyze protein-protein interactions. *Anal. Biochem.* **317**, 226-232 (2003).
49. Cronan, J.E., Jr. Biotinylation of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 10327-10333 (1990).
50. Cronan, J.E., Jr. & Reed, K.E. Biotinylation of proteins in vivo: a useful posttranslational modification for protein analysis. *Methods Enzymol.* **326**, 440-458 (2000).
51. Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P.J. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* **8**, 921-929 (1999).
52. Howarth, M., Takao, K., Hayashi, Y. & Ting, A.Y. Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 7583-7588 (2005).
53. Chen, I., Howarth, M., Lin, W. & Ting, A.Y. Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. *Nat. Methods* **2**, 99-104 (2005).
54. George, N., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, N. & Johnsson, K. Specific labeling of cell surface proteins with chemically diverse compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8896-8897 (2004).
55. Prummer, M., Meyer, B.H., Franzini, R., Segura, J.M., George, N., Johnsson, K. & Vogel, H. Post-translational covalent labeling reveals heterogeneous mobility of individual G protein-coupled receptors in living cells. *ChemBioChem* **7**, 908-911 (2006).
56. Meyer, B.H., Martinez, K.L., Segura, J.M., Pascoal, P., Hovius, R., George, N., Johnsson, K. & Vogel, H. Covalent labeling of cell-surface proteins for in-vivo FRET studies. *FEBS Lett.* **580**, 1654-1658 (2006).
57. Meyer, B.H., Segura, J.M., Martinez, K.L., Hovius, R., George, N., Johnsson, K. & Vogel, H. FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2138-2143 (2006).
58. Yin, J., Straight, P.D., McLoughlin, S.M., Zhou, Z., Lin, A.J., Golan, D.E., Kelleher, N.L., Kolter, R. & Walsh, C.T. Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15815-15820 (2005).
59. Zhou, Z., Cironi, P., Lin, A.J., Xu, Y., Hrvatin, S., Golan, D.E., Silver, P.A., Walsh, C.T. & Yin, J. Genetically encoded short peptide tags for orthogonal protein labeling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases. *ACS Chem. Biol.* **2**, 337-346 (2007).

60. Zhou, Z., Koglin, A., Wang, Y., McMahon, A.P. & Walsh, C.T. An eight residue fragment of an acyl carrier protein suffices for post-translational introduction of fluorescent pantetheinyl arms in protein modification in vitro and in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9925-9930 (2008).
61. Xu-Welliver, M., Leitao, J., Kanugula, S., Meehan, W.J. & Pegg, A.E. Role of codon 160 in the sensitivity of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase to O6-benzylguanine. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1279-1285 (1999).
62. Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H. & Johnsson, K. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat. Biotechnol.* **21**, 86-89 (2003).
63. Juillerat, A., Heinis, C., Sielaff, I., Barnikow, J., Jaccard, H., Kunz, B., Tersikh, A. & Johnsson, K. Engineering substrate specificity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells. *ChemBioChem* **6**, 1263-1269 (2005).
64. Gronemeyer, T., Chidley, C., Juillerat, A., Heinis, C. & Johnsson, K. Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 309-316 (2006).
65. Heinis, C., Schmitt, S., Kindermann, M., Godin, G. & Johnsson, K. Evolving the substrate specificity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase through loop insertion for applications in molecular imaging. *ACS Chem. Biol.* **1**, 575-584 (2006).
66. Los, G.V., Darzins, A., Zimprich, C., Karassina, N., Learish, R., McDougall, M.G., Encell, L.P., Friedman-Ohana, R., Wood, M., Vidugiris, G., Zimmerman, K., Otto, P., Klaubert, D.H. & Wood, K. HaloTag™ interchangeable labeling technology for cell imaging, protein capture and immobilization. *Promega Cell Notes* **11**, 2-6 (2005).
67. Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G., Hartzell, D.D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M.G., Learish, R., Ohana, R.F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D.H., Bulleit, R.F. & Wood, K.V. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* **3**, 373-382 (2008).
68. Lang, C., Schulze, J., Mendel, R.R. & Hansch, R. HaloTag: a new versatile reporter gene system in plant cells. *J. Exp. Bot.* **57**, 2985-2992 (2006).
69. Zhang, Y., So, M.K., Loening, A.M., Yao, H., Gambhir, S.S. & Rao, J. HaloTag protein-mediated site-specific conjugation of bioluminescent proteins to quantum dots. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4936-4940 (2006).
70. So, M.K., Yao, H. & Rao, J. HaloTag protein-mediated specific labeling of living cells with quantum dots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 419-423 (2008).
71. Griffin, B.A., Adams, S.R. & Tsien, R.Y. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**, 269-272 (1998).
72. Adams, S.R., Campbell, R.E., Gross, L.A., Martin, B.R., Walkup, G.K., Yao, Y., Llopis, J. & Tsien, R.Y. New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6063-6076 (2002).
73. Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Garner, C.C., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H. & Malenka, R.C. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* **7**, 244-253 (2004).
74. Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y. & Ellisman, M.H. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296**, 503-507 (2002).
75. Rice, M.C., Czymmek, K. & Kmiec, E.B. The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nat. Biotechnol.* **19**, 321-326 (2001).
76. Tsien, R.Y. Building and breeding molecules to spy on cells and tumors. *FEBS Lett.* **579**, 927-932 (2005).
77. Hoffmann, C., Gaietta, G., Bunemann, M., Adams, S.R., Oberdorff-Maass, S., Behr, B., Vilardaga, J.P., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H. & Lohse, M.J. A FIAsh-based FRET



- approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat. Methods* **2**, 171-176 (2005).
78. Roberti, M.J., Bertoncini, C.W., Klement, R., Jares-Erijman, E.A. & Jovin, T.M. Fluorescence imaging of amyloid formation in living cells by a functional, tetracysteine-tagged alpha-synuclein. *Nat. Methods* **4**, 345-351 (2007).
  79. Gaietta, G.M., Giepmans, B.N., Deerinck, T.J., Smith, W.B., Ngan, L., Llopis, J., Adams, S.R., Tsien, R.Y. & Ellisman, M.H. Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 17777-17782 (2006).
  80. Ignatova, Z. & Gierasch, L.M. Monitoring protein stability and aggregation in vivo by real-time fluorescent labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 523-528 (2004).
  81. Coleman, B.M., Nisbet, R.M., Han, S., Cappai, R., Hatters, D.M. & Hill, A.F. Conformational detection of prion protein with biarsenical labeling and FIAsh fluorescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 564-568 (2009).
  82. Jay, D.G. & Sakurai, T. Chromophore-assisted laser inactivation (CALI) to elucidate cellular mechanisms of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1424**, M39-48 (1999).
  83. Marek, K.W. & Davis, G.W. Transgenically encoded protein photoinactivation (FIAsh-FALI): acute inactivation of synaptotagmin I. *Neuron* **36**, 805-813 (2002).
  84. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599 (1975).
  85. Hochuli, E., Dobeli, H. & Schacher, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **411**, 177-184 (1987).
  86. Meredith, G.D., Wu, H.Y. & Allbritton, N.L. Targeted protein functionalization using His-tags. *Bioconjug. Chem.* **15**, 969-982 (2004).
  87. Hintersteiner, M., Weidemann, T., Kimmerlin, T., Filiz, N., Buehler, C. & Auer, M. Covalent fluorescence labeling of His-tagged proteins on the surface of living cells. *ChemBioChem* **9**, 1391-1395 (2008).
  88. Kapanidis, A.N., Ebright, Y.W. & Ebright, R.H. Site-specific incorporation of fluorescent probes into protein: hexahistidine-tag-mediated fluorescent labeling with (Ni(2+):nitrilotriacetic Acid (n)-fluorochrome conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12123-12125 (2001).
  89. Guignet, E.G., Hovius, R. & Vogel, H. Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 440-444 (2004).
  90. Goldsmith, C.R., Jaworski, J., Sheng, M. & Lippard, S.J. Selective labeling of extracellular proteins containing polyhistidine sequences by a fluorescein-nitrilotriacetic acid conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 418-419 (2006).
  91. Guignet, E.G., Segura, J.M., Hovius, R. & Vogel, H. Repetitive reversible labeling of proteins at polyhistidine sequences for single-molecule imaging in live cells. *ChemPhysChem* **8**, 1221-1227 (2007).
  92. Krishnan, B., Szymanska, A. & Gierasch, L.M. Site-specific fluorescent labeling of polyhistidine sequences using a metal-chelating cysteine. *Chem. Biol. Drug Des.* **69**, 31-40 (2007).
  93. Huang, Z., Park, J.I., Watson, D.S., Hwang, P. & Szoka, F.C., Jr. Facile synthesis of multivalent nitrilotriacetic acid (NTA) and NTA conjugates for analytical and drug delivery applications. *Bioconjug. Chem.* **17**, 1592-1600 (2006).
  94. Lata, S., Reichel, A., Brock, R., Tampé, R. & Piehler, J. High-affinity adaptors for switchable recognition of histidine-tagged proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10205-10215 (2005).
  95. Lata, S. & Piehler, J. Stable and functional immobilization of histidine-tagged proteins via multivalent chelator headgroups on a molecular poly(ethylene glycol) brush. *Anal. Chem.* **77**, 1096-1105 (2005).

96. Strunk, J.J., Gregor, I., Becker, Y., Li, Z., Gavutis, M., Jaks, E., Lamken, P., Walz, T., Enderlein, J. & Piehler, J. Ligand binding induces a conformational change in ifnar1 that is propagated to its membrane-proximal domain. *J. Mol. Biol.* **377**, 725-739 (2008).
97. Wruss, J., Pollheimer, P.D., Meindl, I., Reichel, A., Schulze, K., Schöffberger, W., Piehler, J., Tampé, R., Blaas, D. & Gruber, H.J. Conformation of receptor adopted upon interaction with virus revealed by site-specific fluorescence quenchers and FRET analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **0**.
98. Lata, S., Gavutis, M., Tampé, R. & Piehler, J. Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2365-2372 (2006).
99. Varnes, A.W., Dodson, R.B. & Wehry, E.L. Interactions of transition-metal ions with photoexcited states of flavins. Fluorescence quenching studies. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 946-950 (1972).
100. Richmond, T.A., Takahashi, T.T., Shimkhada, R. & Bernsdorf, J. Engineered metal binding sites on green fluorescence protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 462-465 (2000).
101. Hutschenreiter, S., Neumann, L., Radler, U., Schmitt, L. & Tampé, R. Metal-chelating amino acids as building blocks for synthetic receptors sensing metal ions and histidine-tagged proteins. *ChemBioChem* **4**, 1340-1344 (2003).
102. Sandtner, W., Bezanilla, F. & Correa, A.M. In vivo measurement of intramolecular distances using genetically encoded reporters. *Biophys. J.* **93**, L45-47 (2007).
103. Taraska, J.W., Puljung, M.C., Olivier, N.B., Flynn, G.E. & Zagotta, W.N. Mapping the structure and conformational movements of proteins with transition metal ion FRET. *Nat. Methods* **6**, 532-537 (2009).
104. Kamoto, M., Umezawa, N., Kato, N. & Higuchi, T. Novel probes showing specific fluorescence enhancement on binding to a hexahistidine tag. *Chemistry* **14**, 8004-8012 (2008).
105. Kamoto, M., Umezawa, N., Kato, N. & Higuchi, T. Turn-on fluorescent probe with visible light excitation for labeling of hexahistidine tagged protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2285-2288 (2009).
106. Tinazli, A., Tang, J., Valiokas, R., Picuric, S., Lata, S., Piehler, J., Liedberg, B. & Tampé, R. High-affinity chelator thiols for switchable and oriented immobilization of histidine-tagged proteins: a generic platform for protein chip technologies. *Chemistry* **11**, 5249-5259 (2005).
107. Reichel, A., Schaible, D., Al Furoukh, N., Cohen, M., Schreiber, G. & Piehler, J. Noncovalent, site-specific biotinylation of histidine-tagged proteins. *Anal. Chem.* **79**, 8590-8600 (2007).
108. Roullier, V., Clarke, S., You, C., Pinaud, F., Gouzer, G., Schaible, D., Marchi-Artzner, V., Piehler, J. & Dahan, M. High-affinity labeling and tracking of individual histidine-tagged proteins in live cells using Ni(2+) tris-nitrilotriacetic acid quantum dot conjugates. *Nano Lett.* (2009).
109. Kusnezow, W. & Hoheisel, J.D. Solid supports for microarray immunoassays. *J. Mol. Recognit.* **16**, 165-176 (2003).
110. Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R.A., Gerstein, M. & Snyder, M. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **293**, 2101-2105 (2001).
111. Talasaz, A.H., Nemat-Gorgani, M., Liu, Y., Stahl, P., Dutton, R.W., Ronaghi, M. & Davis, R.W. Prediction of protein orientation upon immobilization on biological and nonbiological surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 14773-14778 (2006).
112. Zhu, H. & Snyder, M. Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 55-63 (2003).
113. Predki, P.F. Functional protein microarrays: ripe for discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 8-13 (2004).

114. Uttamchandani, M., Wang, J. & Yao, S.Q. Protein and small molecule microarrays: powerful tools for high-throughput proteomics. *Mol. Biosyst.* **2**, 58-68 (2006).
115. Cretich, M., Damin, F., Pirri, G. & Chiari, M. Protein and peptide arrays: recent trends and new directions. *Biomol. Eng.* **23**, 77-88 (2006).
116. Tomizaki, K.Y., Usui, K. & Mihara, H. Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements. *ChemBioChem* **6**, 782-799 (2005).
117. Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **8**, 1775-1789 (2007).
118. Jonkheijm, P., Weinrich, D., Schroder, H., Niemeyer, C.M. & Waldmann, H. Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 9618-9647 (2008).
119. Silberzan, P., Leger, L., Ausserre, D. & Benattar, J.J. Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers. *Langmuir* **7**, 1647-1651 (1991).
120. Krasnoslobodtsev, A.V. & Smirnov, S.N. Effect of water on silanization of silica by trimethoxysilanes. *Langmuir* **18**, 3181-3184 (2002).
121. Howarter, J.A. & Youngblood, J.P. Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* **22**, 11142-11147 (2006).
122. Groll, J., Amirgoulova, E.V., Ameringer, T., Heyes, C.D., Rocker, C., Nienhaus, G.U. & Moller, M. Biofunctionalized, ultrathin coatings of cross-linked star-shaped poly(ethylene oxide) allow reversible folding of immobilized proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4234-4239 (2004).
123. Michel, R., Pasche, S., Textor, M. & Castner, D.G. Influence of PEG architecture on protein adsorption and conformation. *Langmuir* **21**, 12327-12332 (2005).
124. Lee, J.H., Kopecek, J. & Andrade, J.D. Protein-resistant surfaces prepared by PEO-containing block copolymer surfactants. *J. Biomed. Mater. Res.* **23**, 351-368 (1989).
125. Herrwerth, S., Eck, W., Reinhardt, S. & Grunze, M. Factors that determine the protein resistance of oligoether self-assembled monolayers --internal hydrophilicity, terminal hydrophilicity, and lateral packing density. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9359-9366 (2003).
126. Ulman, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533-1554 (1996).
127. Chapman, R.G., Ostuni, E., Takayama, S., Holmlin, R.E., Yan, L. & Whitesides, G.M. Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8303-8304 (2000).
128. Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. & Whitesides, G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **105**, 1103-1170 (2005).
129. Bain, C.D. & Whitesides, G.M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7164-7175 (1989).
130. Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G.M. & Laibinis, P.E. Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *J. Phys. Chem. B* **102**, 426-436 (1998).
131. Mrksich, M., Sigal, G.B. & Whitesides, G.M. Surface plasmon resonance permits in situ measurement of protein adsorption on self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Langmuir* **11**, 4383-4385 (1995).
132. Prime, K.L. & Whitesides, G.M. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10714-10721 (1993).
133. Löfas, S. & Johnsson, B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1526-1528 (1990).

134. Löfas, S., Johnsson, B., Edström, Å., Hansson, A., Lindquist, G., Hillgren, R.-M.M. & Stigh, L. Methods for site controlled coupling to carboxymethyl dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors. *Biosens. Bioelectron.* **10**, 813-822 (1995).
135. Johnsson, B., Lofas, S., Lindquist, G., Edstrom, A., Muller Hillgren, R.M. & Hansson, A. Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies. *J. Mol. Recognit.* **8**, 125-131 (1995).
136. Piletsky, S., Piletska, E., Bossi, A., Turner, N. & Turner, A. Surface functionalization of porous polypropylene membranes with polyaniline for protein immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 86-92 (2003).
137. Wilson, D.L., Martin, R., Hong, S., Cronin-Golomb, M., Mirkin, C.A. & Kaplan, D.L. Surface organization and nanopatterning of collagen by dip-pen nanolithography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13660-13664 (2001).
138. Lee, K.-B., Lim, J.-H. & Mirkin, C.A. Protein nanostructures formed via direct-write dip-pen nanolithography. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 5588-5589 (2003).
139. MacBeath, G. & Schreiber, S.L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289**, 1760-1763 (2000).
140. Patel, N., Davies, M.C., Hartshorne, M., Heaton, R.J., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B. & Williams, P.M. Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* **13**, 6485-6490 (1997).
141. Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A. & Guisan, J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 546-550 (1993).
142. Slocik, J.M., Beckel, E.R., Jiang, H., Enlow, J.O., Zabinski, J.S., Bunning Jr., T.J. & Naik, R.R. Site-specific patterning of biomolecules and quantum dots on functionalized surfaces generated by plasma-enhanced chemical vapor deposition. *Adv. Mater.* **18**, 2095-2100 (2006).
143. Rozsnyai L.F., Benson D.R., Fodor S.P.A. & Schultz P.G. Photolithographic immobilization of biopolymers on solid supports. *Angew. Chem. Int. Ed.* **31**, 759-761 (1992).
144. Blawas, A.S., Oliver, T.F., Pirrung, M.C. & Reichert, W.M. Step-and-repeat photopatterning of protein features using caged-biotin-BSA: characterization and resolution. *Langmuir* **14**, 4243-4250 (1998).
145. Muller, W., Ringsdorf, H., Rump, E., Wildburg, G., Zhang, X., Angermaier, L., Knoll, W., Liley, M. & Spinke, J. Attempts to mimic docking processes of the immune system: recognition-induced formation of protein multilayers. *Science* **262**, 1706-1708 (1993).
146. Holland-Nell, K. & Beck-Sickinger, A.G. Specifically immobilised aldol/keto reductase AKR1A1 shows a dramatic increase in activity relative to the randomly immobilised enzyme. *ChemBioChem* **8**, 1071-1076 (2007).
147. Jonkheijm, P., Weinrich, D., Kohn, M., Engelkamp, H., Christianen, P.C., Kuhlmann, J., Maan, J.C., Nüsse, D., Schroeder, H., Wacker, R., Breinbauer, R., Niemeyer, C.M. & Waldmann, H. Photochemical surface patterning by the thiol-ene reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 4421-4424 (2008).
148. Turkova, J. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **722**, 11-31 (1999).
149. Jung, Y., Jeong, J.Y. & Chung, B.H. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. *Analyst* **133**, 697-701 (2008).
150. Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B., Eisenstein, S., Rosen, B., Lau, A.Y., Walter, J.C. & LaBaer, J. Self-assembling protein microarrays. *Science* **305**, 86-90 (2004).
151. Becker, C.F., Wacker, R., Bouschen, W., Seidel, R., Kolaric, B., Lang, P., Schroeder, H., Muller, O., Niemeyer, C.M., Spengler, B., Goody, R.S. & Engelhard, M. Direct readout of

- protein-protein interactions by mass spectrometry from protein-DNA microarrays. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 7635-7639 (2005).
152. Bailey, R.C., Kwong, G.A., Radu, C.G., Witte, O.N. & Heath, J.R. DNA-encoded antibody libraries: a unified platform for multiplexed cell sorting and detection of genes and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1959-1967 (2007).
  153. Camarero, J.A., Kwon, Y. & Coleman, M.A. Chemoselective attachment of biologically active proteins to surfaces by expressed protein ligation and its application for "protein chip" fabrication. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14730-14731 (2004).
  154. Kwon, Y., Coleman, M.A. & Camarero, J.A. Selective immobilization of proteins onto solid supports through split-intein-mediated protein trans-splicing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1726-1729 (2006).
  155. Kindermann, M., George, N., Johnsson, N. & Johnsson, K. Covalent and selective immobilization of fusion proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7810-7811 (2003).
  156. Sielaff, I., Arnold, A., Godin, G., Tugulu, S., Klok, H.A. & Johnsson, K. Protein function microarrays based on self-immobilizing and self-labeling fusion proteins. *ChemBioChem* **7**, 194-202 (2006).
  157. Watzke, A., Kohn, M., Gutierrez-Rodriguez, M., Wacker, R., Schroder, H., Breinbauer, R., Kuhlmann, J., Alexandrov, K., Niemeyer, C.M., Goody, R.S. & Waldmann, H. Site-selective protein immobilization by Staudinger ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1408-1412 (2006).
  158. Kalia, J., Abbott, N.L. & Raines, R.T. General method for site-specific protein immobilization by Staudinger ligation. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1064-1069 (2007).
  159. de Araujo, A.D., Palomo, J.M., Cramer, J., Seitz, O., Alexandrov, K. & Waldmann, H. Diels-Alder ligation of peptides and proteins. *Chemistry* **12**, 6095-6109 (2006).
  160. Duckworth, B.P., Xu, J., Taton, T.A., Guo, A. & Distefano, M.D. Site-specific, covalent attachment of proteins to a solid surface. *Bioconjug. Chem.* **17**, 967-974 (2006).
  161. Govindaraju, T., Jonkheijm, P., Gogolin, L., Schroeder, H., Becker, C.F., Niemeyer, C.M. & Waldmann, H. Surface immobilization of biomolecules by click sulfonamide reaction. *Chem. Commun. (Camb)*, 3723-3725 (2008).
  162. Dorn, I.T., Pawlitschko, K., Pettinger, S.C. & Tampé, R. Orientation and two-dimensional organization of proteins at chelator lipid interfaces. *Biol. Chem.* **379**, 1151-1159 (1998).
  163. Dietrich, C., Schmitt, L. & Tampé, R. Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self-assembled lipid interfaces using a novel class of chelator lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9014-9018 (1995).
  164. Radler, U., Mack, J., Persike, N., Jung, G. & Tampé, R. Design of supported membranes tethered via metal-affinity ligand-receptor pairs. *Biophys. J.* **79**, 3144-3152 (2000).
  165. Sigal, G.B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J. & Whitesides, G.M. A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* **68**, 490-497 (1996).
  166. Gershon, P.D. & Khilko, S. Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *J. Immunol. Methods* **183**, 65-76 (1995).
  167. Knecht, S., Ricklin, D., Eberle, A.N. & Ernst, B. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni(2+)-NTA surfaces. *J. Mol. Recognit.* (2009).
  168. Kim, J.S., Valencia, C.A., Liu, R. & Lin, W. Highly-efficient purification of native polyhistidine-tagged proteins by multivalent NTA-modified magnetic nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **18**, 333-341 (2007).
  169. Li, Y.C., Lin, Y.S., Tsai, P.J., Chen, C.T., Chen, W.Y. & Chen, Y.C. Nitrilotriacetic acid-coated magnetic nanoparticles as affinity probes for enrichment of histidine-tagged proteins and phosphorylated peptides. *Anal. Chem.* **79**, 7519-7525 (2007).

170. Khan, F., He, M. & Taussig, M.J. Double-hexahistidine tag with high-affinity binding for protein immobilization, purification, and detection on Ni-nitrilotriacetic acid surfaces. *Anal. Chem.* **78**, 3072-3079 (2006).
171. Valiokas, R., Klenkar, G., Tinazli, A., Reichel, A., Tampé, R., Piehler, J. & Liedberg, B. Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid groups: characterization and application. *Langmuir* **24**, 4959-4967 (2008).
172. Valiokas, R., Klenkar, G., Tinazli, A., Tampé, R., Liedberg, B. & Piehler, J. Differential protein assembly on micropatterned surfaces with tailored molecular and surface multivalency. *ChemBioChem* **7**, 1325-1329 (2006).
173. Tinazli, A., Piehler, J., Beuttler, M., Guckenberger, R. & Tampé, R. Native protein nanolithography that can write, read and erase. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 220-225 (2007).
174. Artelsmair, H., Kienberger, F., Tinazli, A., Schlapak, R., Zhu, R., Preiner, J., Wruss, J., Kastner, M., Saucedo-Zeni, N., Hoelzl, M., Rankl, C., Baumgartner, W., Howorka, S., Blaas, D., Gruber, H.J., Tampé, R. & Hinterdorfer, P. Atomic force microscopy-derived nanoscale chip for the detection of human pathogenic viruses. *Small* **4**, 847-854 (2008).
175. Gavutis, M., Lata, S. & Piehler, J. Probing 2-dimensional protein-protein interactions on model membranes. *Nat. Protoc.* **1**, 2091-2103 (2006).
176. Lata, S., Gavutis, M. & Piehler, J. Monitoring the dynamics of ligand-receptor complexes on model membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6-7 (2006).
177. Lata, S. & Piehler, J. Synthesis of a multivalent chelator lipid for stably tethering histidine-tagged proteins onto membranes. *Nat. Protoc.* **1**, 2104-2109 (2006).
178. Gavutis, M., Lata, S., Lamken, P., Muller, P. & Piehler, J. Lateral ligand-receptor interactions on membranes probed by simultaneous fluorescence-interference detection. *Biophys. J.* **88**, 4289-4302 (2005).
179. Xia, Y. & Whitesides, G.M. Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 550-575 (1998).
180. Piner, R.D., Zhu, J., Xu, F., Hong, S. & Mirkin, C.A. "Dip-Pen" nanolithography. *Science* **283**, 661-663 (1999).
181. Christman, K.L., Enriquez-Rios, V.D. & Maynard, H.D. Nanopatterning proteins and peptides. *Soft Matter* **2**, 928-939 (2006).
182. You, C., Bhagawati, M., Brecht, A. & Piehler, J. Affinity capturing for targeting proteins into micro and nanostructures. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 1563-1570 (2009).
183. Klenkar, G., Valiokas, R., Lundstrom, I., Tinazli, A., Tampé, R., Piehler, J. & Liedberg, B. Piezo dispensed microarray of multivalent chelating thiols for dissecting complex protein-protein interactions. *Anal. Chem.* **78**, 3643-3650 (2006).
184. Fan, H., Lu, Y., Stump, A., Reed, S.T., Baer, T., Schunk, R., Perez-Luna, V.V., Lopez, G.P. & Brinker, C.J. Rapid prototyping of patterned functional nanostructures. *Nature* **405**, 56-60 (2000).
185. Turchanin, A., Tinazli, A., El-Desawy, M., Großmann, H., Schnietz, M., Solak, H.H., Tampé, R. & Götzhäuser, A. Molecular self-assembly, chemical lithography, and biochemical tweezers: a path for the fabrication of functional nanometer-scale protein arrays. *Adv. Mater.* **20**, 471-477 (2008).
186. Alonso, J.M., Reichel, A., Piehler, J. & del Campo, A. Photopatterned surfaces for site-specific and functional immobilization of proteins. *Langmuir* **24**, 448-457 (2008).
187. Reynolds, N.P., Tucker, J.D., Davison, P.A., Timney, J.A., Hunter, C.N. & Leggett, G.J. Site-specific immobilization and micrometer and nanometer scale photopatterning of yellow fluorescent protein on glass surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 896-897 (2009).
188. Lata, S. Doktorarbeit, J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main (2005).
189. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985).

190. Akopian, T.N., Kisselev, A.F. & Goldberg, A.L. Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.* **272**, 1791-1798 (1997).
191. Fields, G.B. & Noble, R.L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**, 161-214 (1990).
192. Vojtkovsky, T. Detection of secondary amines on solid phase. *Pept. Res.* **8**, 236-237 (1995).
193. Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. & Cook, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595-598 (1970).
194. Crespo, L., Sanclimens, G., Montaner, B., Perez-Tomas, R., Royo, M., Pons, M., Albericio, F. & Giralt, E. Peptide dendrimers based on polyproline helices. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8876-8883 (2002).
195. Arora, P.S., Ansari, A.Z., Best, T.P., Ptashne, M. & Dervan, P.B. Design of artificial transcriptional activators with rigid poly-L-proline linkers. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 13067-13071 (2002).
196. Best, R.B., Merchant, K.A., Gopich, I.V., Schuler, B., Bax, A. & Eaton, W.A. Effect of flexibility and cis residues in single-molecule FRET studies of polyproline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 18964-18969 (2007).
197. Sahoo, H., Roccatano, D., Hennig, A. & Nau, W.M. A 10-Å spectroscopic ruler applied to short polyprolines. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9762-9772 (2007).
198. Schuler, B., Lipman, E.A. & Eaton, W.A. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* **419**, 743-747 (2002).
199. Cowan, P.M. & McGavin, S. Structure of poly-L-proline. *Nature* **176**, 501-503 (1955).
200. Williamson, M.P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**, 249-260 (1994).
201. Stryer, L. & Haugland, R.P. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 719-726 (1967).
202. Schuler, B., Lipman, E.A., Steinbach, P.J., Kumke, M. & Eaton, W.A. Polyproline and the "spectroscopic ruler" revisited with single-molecule fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2754-2759 (2005).
203. Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. & Shao, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474 (1997).
204. van der Does, C., Presenti, C., Schulze, K., Dinkelaker, S. & Tampé, R. Kinetics of the ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of Mdl1 studied by a novel site-specific labeling technique. *J. Biol. Chem.* **281**, 5694-5701 (2006).
205. Herget, M., Kreissig, N., Kolbe, C., Schölz, C., Schulze, K., Tampé, R. & Abele, R. Purification and reconstitution of the antigen transport complex TAP: A prerequisite for determination of peptide stoichiometry, ATP binding and hydrolysis. *submitted* (2009).
206. Voges, D., Zwickl, P. & Baumeister, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015-1068 (1999).
207. Goldberg, A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895-899 (2003).
208. Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. & Huber, R. Molecular machines for protein degradation. *ChemBioChem* **6**, 222-256 (2005).
209. Ciechanover, A. Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 5944-5967 (2005).

210. Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. & Huber, R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471 (1997).
211. Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H. & Finley, D. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1062-1067 (2000).
212. Forster, A., Whitby, F.G. & Hill, C.P. The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation. *EMBO J.* **22**, 4356-4364 (2003).
213. Groll, M. & Huber, R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **35**, 606-616 (2003).
214. Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C.C. & Hill, C.P. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**, 115-120 (2000).
215. Groll, M., Brandstetter, H., Bartunik, H., Bourenkow, G. & Huber, R. Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes. *J. Mol. Biol.* **327**, 75-83 (2003).
216. Smith, D.M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T. & Goldberg, A.L. ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol. Cell* **20**, 687-698 (2005).
217. Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. & Huber, R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539 (1995).
218. Baumeister, W. & Lupas, A. The proteasome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 273-278 (1997).
219. Hutschenreiter, S., Tinazli, A., Model, K. & Tampé, R. Two-substrate association with the 20S proteasome at single-molecule level. *EMBO J.* **23**, 2488-2497 (2004).
220. Hua, S., To, W.Y., Nguyen, T.T., Wong, M.L. & Wang, C.C. Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **78**, 33-46 (1996).
221. Jahn, W. Review: chemical aspects of the use of gold clusters in structural biology. *J. Struct. Biol.* **127**, 106-112 (1999).
222. Hainfeld, J.F. & Furuya, F.R. A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 177-184 (1992).
223. [www.nanoprob.com](http://www.nanoprob.com).
224. Hainfeld, J.F. & Powell, R.D. New frontiers in gold labeling. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 471-480 (2000).
225. Hainfeld, J.F., Powell, R.D. & Furuya, F.R. Microscopic uses of nanogold. in *Gold and silver staining: techniques in molecular morphology* (ed. Hacker, G.a.G., J. Eds.) 85-106 (CRC Press, Boca Raton, 2002).
226. Hainfeld, J.F., Liu, W., Halsey, C.M., Freimuth, P. & Powell, R.D. Ni-NTA-gold clusters target His-tagged proteins. *J. Struct. Biol.* **127**, 185-198 (1999).
227. Buchel, C., Morris, E., Orlova, E. & Barber, J. Localisation of the PsbH subunit in photosystem II: a new approach using labelling of His-tags with a Ni(2+)-NTA gold cluster and single particle analysis. *J. Mol. Biol.* **312**, 371-379 (2001).
228. Bumba, L., Tichy, M., Dobakova, M., Komenda, J. & Vacha, F. Localization of the PsbH subunit in photosystem II from the *Synechocystis* 6803 using the His-tagged Ni-NTA Nanogold labeling. *J. Struct. Biol.* **152**, 28-35 (2005).
229. Pye, V.E., Beuron, F., Keetch, C.A., McKeown, C., Robinson, C.V., Meyer, H.H., Zhang, X. & Freemont, P.S. Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 467-472 (2007).
230. [http://xmipp.cnb.csic.es/NewXmipp/Web\\_Site/public\\_html/](http://xmipp.cnb.csic.es/NewXmipp/Web_Site/public_html/).



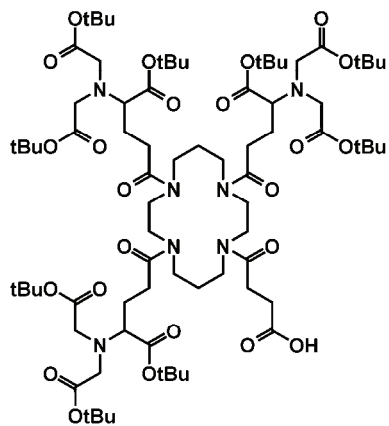
231. Woehrle, G.H., Brown, L.O. & Hutchison, J.E. Thiol-functionalized, 1.5-nm gold nanoparticles through ligand exchange reactions: scope and mechanism of ligand exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2172-2183 (2005).
232. Hainfeld, J.F. & Furuya, F.R. Derivatized gold clusters and antibody-gold cluster conjugates. (Associated Universities, Inc., Washington, D.C., 1994).
233. Strunk, J.J., Gregor, I., Becker, Y., Lamken, P., Lata, S., Reichel, A., Enderlein, J. & Piehler, J. Probing protein conformations by in situ non-covalent fluorescence labeling. *Bioconjug. Chem.* **20**, 41-46 (2009).
234. Mulder, A., Auletta, T., Sartori, A., Del Ciotto, S., Casnati, A., Ungaro, R., Huskens, J. & Reinhoudt, D.N. Divalent binding of a bis(adamantyl)-functionalized calix[4]arene to beta-cyclodextrin-based hosts: an experimental and theoretical study on multivalent binding in solution and at self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6627-6636 (2004).
235. Krishnamurthy, V.M., Semetey, V., Bracher, P.J., Shen, N. & Whitesides, G.M. Dependence of effective molarity on linker length for an intramolecular protein-ligand system. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1312-1320 (2007).
236. Mulder, A., Huskens, J. & Reinhoudt, D.N. Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 3409-3424 (2004).
237. Mayer, G. & Heckel, A. Biologically active molecules with a "light switch". *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4900-4921 (2006).
238. Rodenko, B., Toebes, M., Hadrup, S.R., van Esch, W.J., Molenaar, A.M., Schumacher, T.N. & Ovaa, H. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat. Protoc.* **1**, 1120-1132 (2006).
239. Grotenbreg, G.M., Roan, N.R., Guillen, E., Meijers, R., Wang, J.H., Bell, G.W., Starnbach, M.N. & Ploegh, H.L. Discovery of CD8+ T cell epitopes in Chlamydia trachomatis infection through use of caged class I MHC tetramers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3831-3836 (2008).
240. Bakker, A.H., Hoppes, R., Linnemann, C., Toebes, M., Rodenko, B., Berkers, C.R., Hadrup, S.R., van Esch, W.J., Heemskerk, M.H., Ovaa, H. & Schumacher, T.N. Conditional MHC class I ligands and peptide exchange technology for the human MHC gene products HLA-A1, -A3, -A11, and -B7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3825-3830 (2008).
241. Toebes, M., Coccoris, M., Bins, A., Rodenko, B., Gomez, R., Nieuwkoop, N.J., van de Kastele, W., Rimmelzwaan, G.F., Haanen, J.B., Ovaa, H. & Schumacher, T.N. Design and use of conditional MHC class I ligands. *Nat. Med.* **12**, 246-251 (2006).
242. Li, H., Hah, J.M. & Lawrence, D.S. Light-mediated liberation of enzymatic activity: "small molecule" caged protein equivalents. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10474-10475 (2008).
243. Parker, L.L., Kurutz, J.W., Kent, S.B. & Kron, S.J. Control of the yeast cell cycle with a photocleavable alpha-factor analogue. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 6322-6325 (2006).
244. Pelliccioli, A.P. & Wirz, J. Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 441-458 (2002).
245. Sundberg, S.A., Barrett, R.W., Pirrung, M., Lu, A.L., Kiangsoontra, B. & Holmes, C.P. Spatially-addressable immobilization of macromolecules on solid supports. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12050-12057 (1995).
246. Pirrung, M.C. & Huang, C.Y. A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using "caged" biotin. *Bioconjug. Chem.* **7**, 317-321 (1996).
247. Banala, S., Arnold, A. & Johnsson, K. Caged substrates for protein labeling and immobilization. *ChemBioChem* **9**, 38-41 (2008).
248. Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T. & Solas, D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**, 767-773 (1991).
249. Pellois, J.P., Wang, W. & Gao, X. Peptide synthesis based on t-Boc chemistry and solution photogenerated acids. *J. Comb. Chem.* **2**, 355-360 (2000).

250. Cho, C.Y., Moran, E.J., Cherry, S.R., Stephans, J.C., Fodor, S.P., Adams, C.L., Sundaram, A., Jacobs, J.W. & Schultz, P.G. An unnatural biopolymer. *Science* **261**, 1303-1305 (1993).
251. Li, S., Bowerman, D., Marthandan, N., Klyza, S., Luebke, K.J., Garner, H.R. & Kodadek, T. Photolithographic synthesis of peptoids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4088-4089 (2004).
252. Ryan, D., Parviz, B.A., Linder, V., Semetey, V., Sia, S.K., Su, J., Mrksich, M. & Whitesides, G.M. Patterning multiple aligned self-assembled monolayers using light. *Langmuir* **20**, 9080-9088 (2004).
253. Christman, K.L., Requa, M.V., Enriquez-Rios, V.D., Ward, S.C., Bradley, K.A., Turner, K.L. & Maynard, H.D. Submicron streptavidin patterns for protein assembly. *Langmuir* **22**, 7444-7450 (2006).
254. Holmes, C.P. & Jones, D.G. Reagents for Combinatorial organic synthesis: Development of a new o-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase synthesis. *J. Org. Chem.* **60**, 2318-2319 (1995).
255. Sternson, S.M. & Schreiber, S.L. An acid- and base-stable o-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7451-7454 (1998).
256. Parker, L.L., Brueggemeier, S.B., Rhee, W.J., Wu, D., Kent, S.B., Kron, S.J. & Palecek, S.P. Photocleavable peptide hydrogel arrays for MALDI-TOF analysis of kinase activity. *Analyst* **131**, 1097-1104 (2006).
257. Brown, B.B., Wagner, D.S. & Geysen, H.M. A single-bead decode strategy using electrospray ionization mass spectrometry and a new photolabile linker: 3-amino-3-(2-nitrophenyl)propionic acid. *Mol. Divers.* **1**, 4-12 (1995).
258. Kessler, M., Glatthar, R., Giese, B. & Bochet, C.G. Sequentially photocleavable protecting groups in solid-phase synthesis. *Org. Lett.* **5**, 1179-1181 (2003).
259. Nakayama, K., Tachikawa, T. & Majima, T. Protein recording material: photorecord/erasable protein array using a UV-eliminative linker. *Langmuir* **24**, 1625-1628 (2008).
260. Yan, F., Chen, L., Tang, Q. & Wang, R. Synthesis and characterization of a photocleavable cross-linker and its application on tunable surface modification and protein photodelivery. *Bioconjug. Chem.* **15**, 1030-1036 (2004).
261. Collioud, A., Clemence, J.F., Sanger, M. & Sigrist, H. Oriented and covalent immobilization of target molecules to solid supports: synthesis and application of a light-activatable and thiol-reactive cross-linking reagent. *Bioconjug. Chem.* **4**, 528-536 (1993).
262. Philipona, C., Chevolut, Y., Leonard, D., Mathieu, H.J., Sigrist, H. & Marquis-Weible, F. A scanning near-field optical microscope approach to biomolecule patterning. *Bioconjug. Chem.* **12**, 332-336 (2001).
263. Neves-Petersen, M.T., Snabe, T., Klitgaard, S., Duroux, M. & Petersen, S.B. Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces. *Protein Sci.* **15**, 343-351 (2006).
264. Kanoh, N., Kumashiro, S., Simizu, S., Kondoh, Y., Hatakeyama, S., Tashiro, H. & Osada, H. Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein-small-molecule interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 5584-5587 (2003).
265. Wieboldt, R., Ramesh, D., Jabri, E., Karplus, P.A., Carpenter, B.K. & Hess, G.P. Synthesis and characterization of photolabile o-nitrobenzyl derivatives of urea. *J. Org. Chem.* **67**, 8827-8831 (2002).
266. Gaplovsky, M., Il'ichev, Y.V., Kamdzhilov, Y., Kombarova, S.V., Mac, M., Schworer, M.A. & Wirz, J. Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds: 2-nitrobenzyl alcohols form 2-nitroso hydrates by dual proton transfer. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 33-42 (2005).
267. Moser, R., Snyers, L., Wruss, J., Angulo, J., Peters, H., Peters, T. & Blaas, D. Neutralization of a common cold virus by concatemers of the third ligand binding module

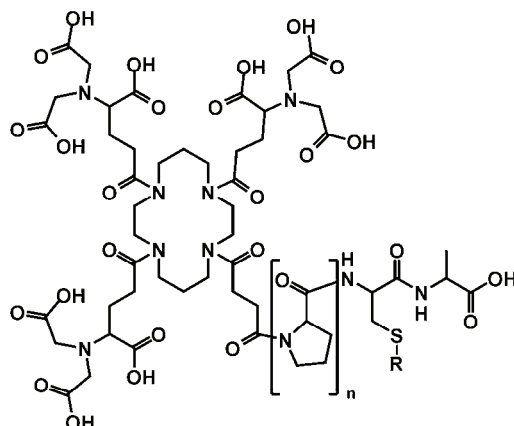
---

of the VLDL-receptor strongly depends on the number of modules. *Virology* **338**, 259-269 (2005).

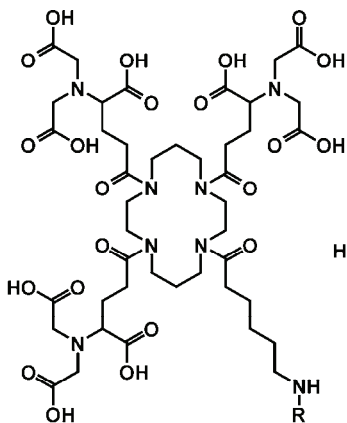
## XII STRUKTURFORMELN



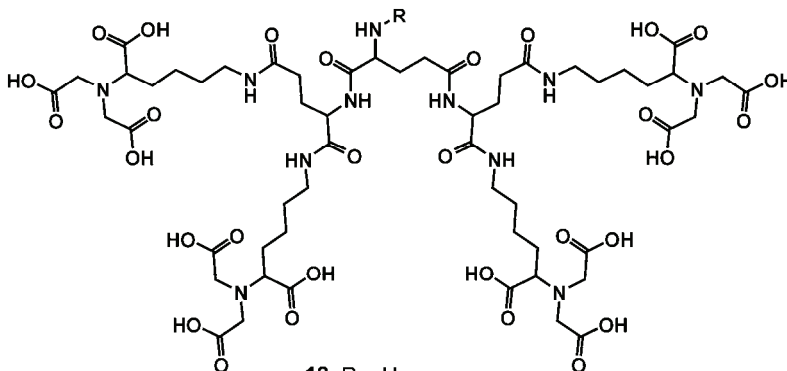
1



R = H	R = OG488	R = ATTO565
2: n = 4	5: n = 4	6: n = 4
3: n = 8	7: n = 8	8: n = 8
4: n = 12	9: n = 12	10: n = 12

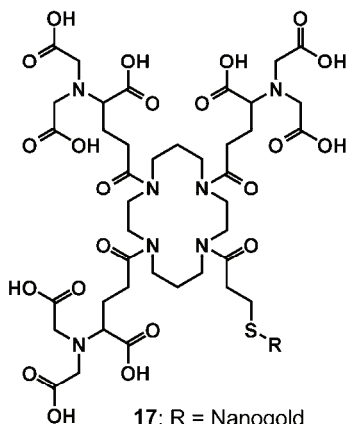


11: R = H  
14: R = Fluoreszein

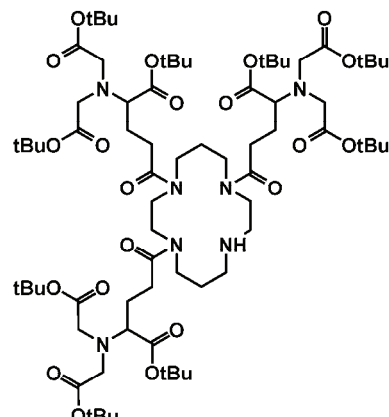


12: R = H  
13: R = Fluoreszein  
15: R = ATTO565

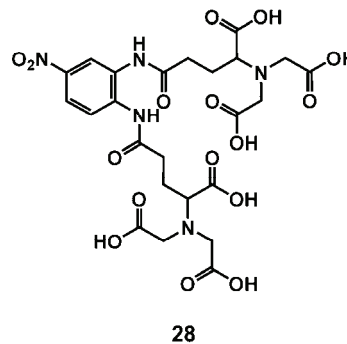
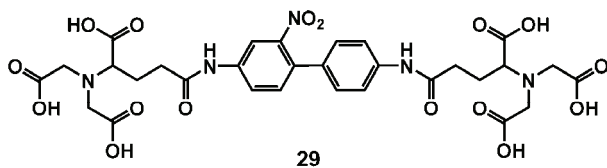
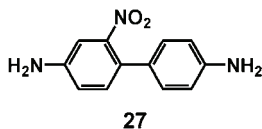
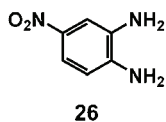
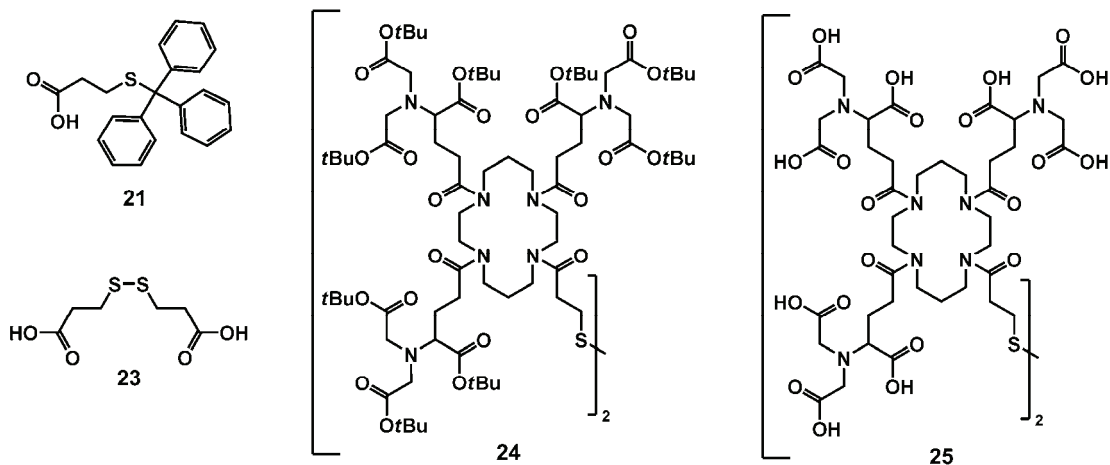
16: Ni-NTA-Nanogold  
18: Monomaleimido-Nanogold



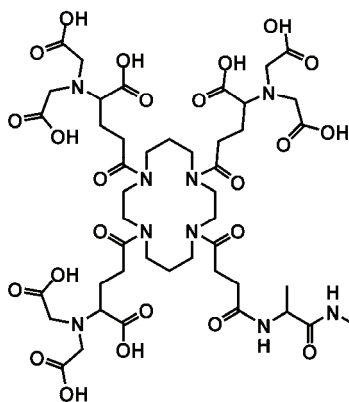
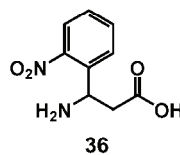
17: R = Nanogold  
19: R = H  
22: R = Trt  
23: R = tBu



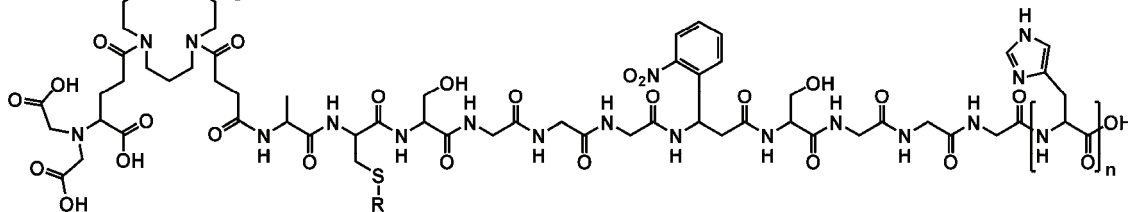
20

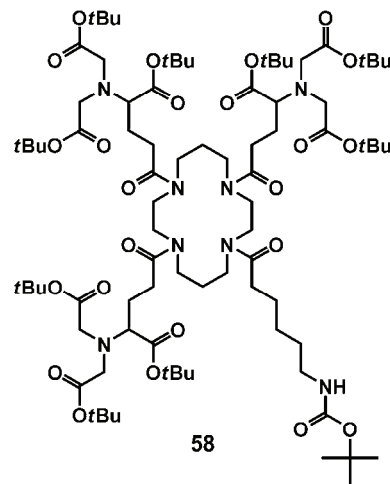
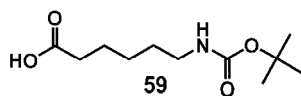
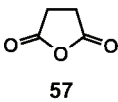
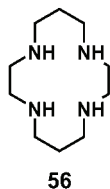
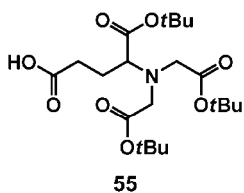
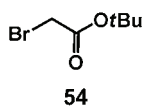
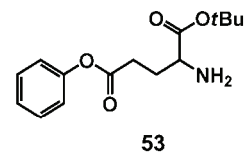
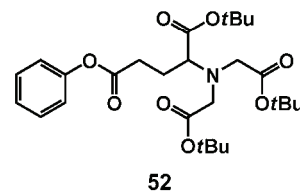
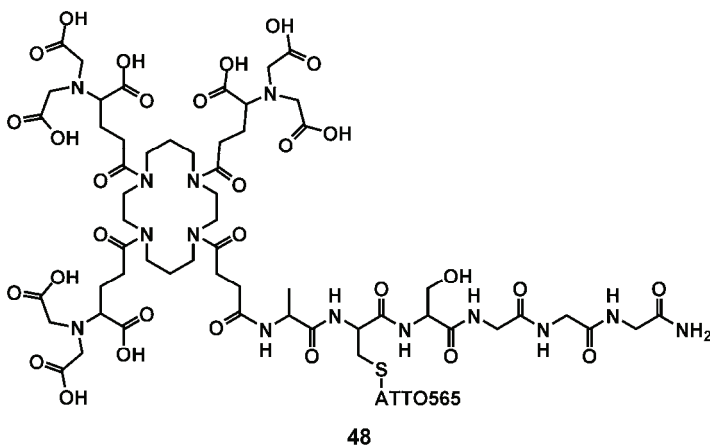
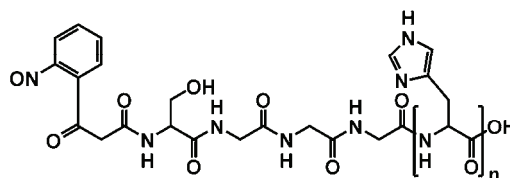
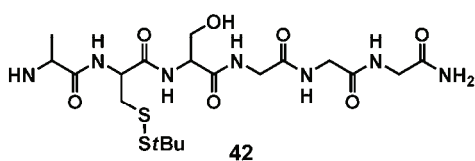
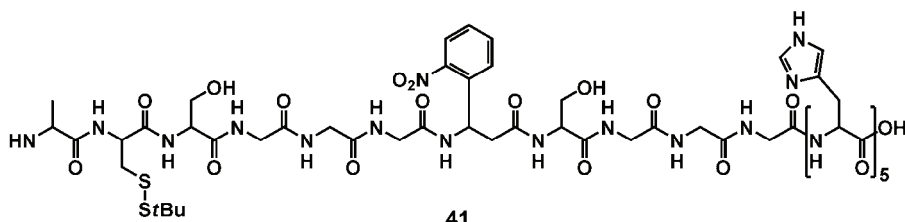


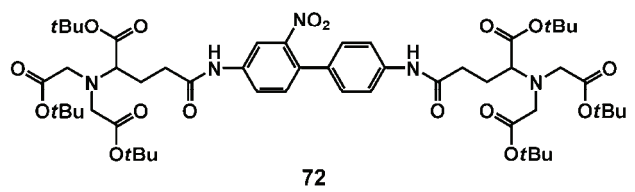
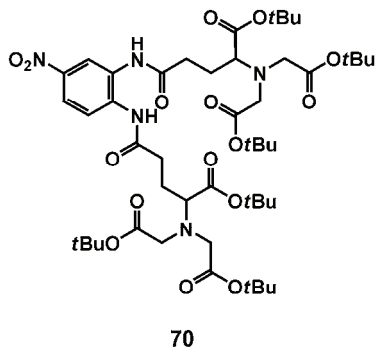
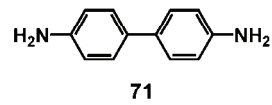
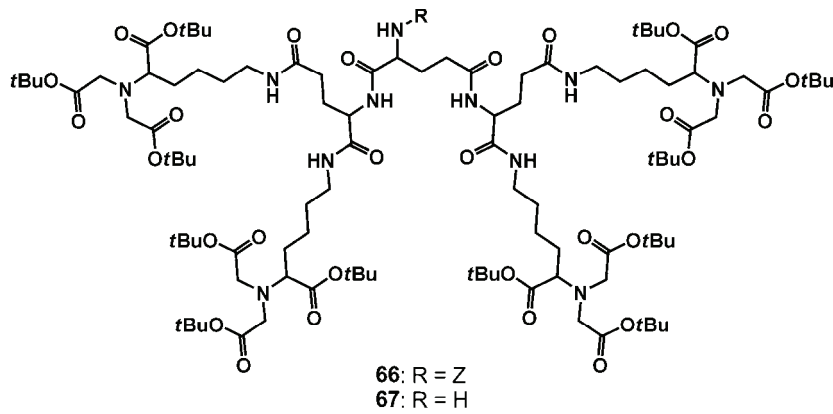
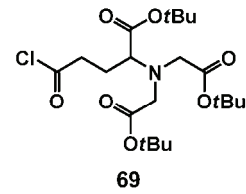
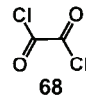
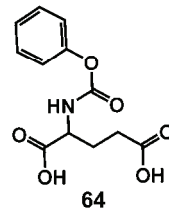
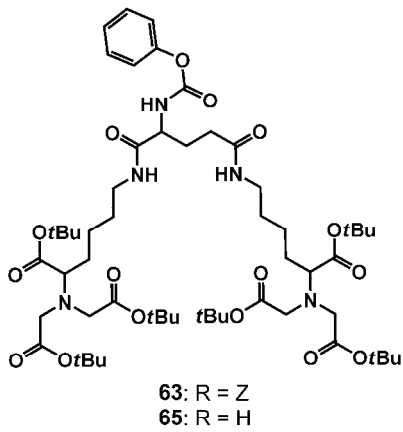
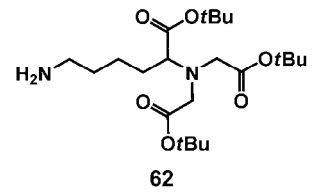
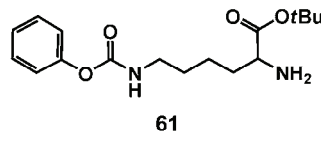
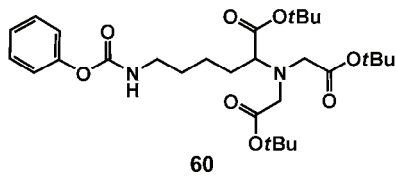
- 30: Fluoreszein-HHHH
- 31: Fluoreszein-HHHHH
- 32: Fluoreszein-HHHPPPPHHH
- 33: Fluoreszein-HHHPPPPPPPPHHH
- 34: Fluoreszein-HAHPPPPHAH
- 35: Fluoreszein-HAHPPPPPPPPHAH



- |           |             |
|-----------|-------------|
| R = H     | R = ATTO565 |
| 37: n = 3 | 44: n = 3   |
| 38: n = 4 | 45: n = 4   |
| 39: n = 5 | 46: n = 5   |
| 40: n = 6 | 47: n = 6   |







---

**XIII LEBENSLAUF**

---

**KATRIN SCHULZE**

Anschrift: Heddernheimer Landstr. 10  
60439 Frankfurt am Main

Telefon: 069-95770757

E-Mail: schulze@biochem.uni-frankfurt.de

Geboren: 15. Juni 1977 in Schleswig

Familienstand: ledig, keine Kinder



---

**HOCHSCHULSTUDIUM & PROMOTION**

---

- seit 02/04 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Robert Tampé  
Institut für Biochemie der Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Thema: *„Markierung, Manipulation und strukturierte Organisation von Proteinen mit multivalenten NTA-Chelatoren“*
- 01/03-09/03 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Rainer Herges  
Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Thema: *„Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur Cyclisierung von o-Ethynylstyrol und 1,4-Di-(2-vinylphenyl)-1,3-butadiin“*
- 30.09.03 Diplom-Hauptprüfung Chemie  
Wahlfach: Kolloidchemie  
Gesamtnote: *„sehr gut“*
- 10/00-09/03 Hauptstudium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Schwerpunkt: Organische Chemie
- 12.10.00 Diplom-Vorprüfung  
Gesamtnote: *„gut“*
- 10/98-09/00 Grundstudium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 03/97-09/98 Grundstudium der Verfahrenstechnik an der Fachhochschule Flensburg



---

**SCHULBILDUNG**

---

- 08/87-07/96      Gymnasium Lornsenschule Schleswig  
Allgemeine Hochschulreife, Abschlussnote: 3.1
- 08/83-07/87      Grundschule Nord Schleswig

---

**ANSTELLUNGEN IM BERUF & PRAKTIKA**

---

- seit 02/04      Goethe Universität-Frankfurt am Main  
Wissenschaftliche Angestellte
- 01/03-06/03      Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Hilfswissenschaftliche Angestellte (Gestaltung von Internetseiten für  
das Projekt „Vernetztes Studium“)
- 08/01-09/01      BASF AG Ludwigshafen, Abteilung Forschung Farbmittel  
freiwilliges Industriepraktikum im Bereich Spezialprodukte  
(Stabilisatoren für Vinylmonomere)
- 11/00-02/01      Geomar Kiel  
Wissenschaftliche Hilfskraft (Aufarbeitung von Sedimentproben)
- 01/97-02/97      Schleswiger Werkstätten  
Betriebspraktikum im Bereich der Metallverarbeitung
- 09/96-12/96      Zuckerfabrik Schleswig  
Praktikum im Betriebslaboratorium

---

**KONFERENZEN & POSTERPRÄSENTATIONEN**

---

- Workshop „ChemBionics: Prospects of biohybrid molecules“, 26.-29.11.06,  
Marburg  
Posterbeitrag: „*Multivalent Chelators for Protein Labeling and Manipulation*“
- Konferenz „Applications of BioCalorimetry“, 04.-07.07.06, Zaragossa, Spanien
- International Summer School „Bio-Image“, 11.-22.07.05, Paris, Frankreich  
Posterbeitrag: „*Multivalent Biochemical Tweezers for Manipulation and Labeling of  
Proteins*“
- Workshop „NanoBionics III – from Molecules to Applications“, 04.-08.04.05,  
Marburg  
Posterbeitrag: „*Multivalent Biochemical Tweezers for Manipulation and Labeling of  
Proteins*“