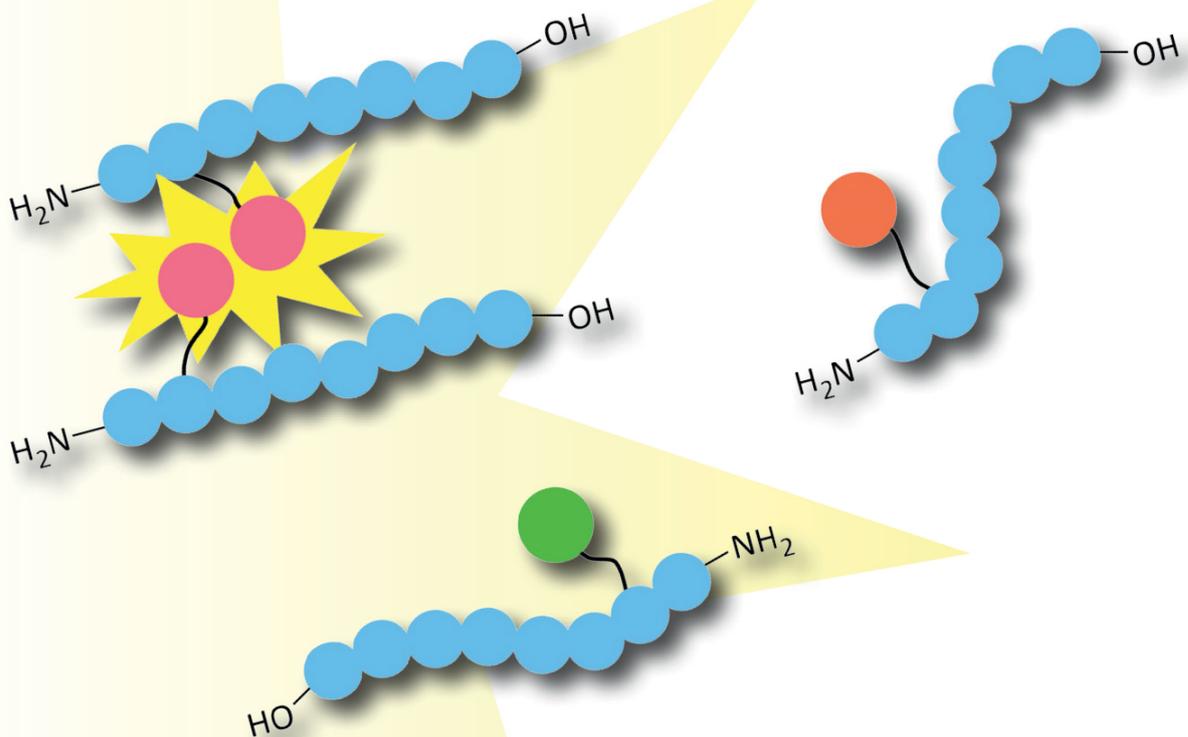


Swantje Nawratil

# Entwicklung Fluoreszenz-generierender und Auxiliar-vermittelter Peptidligationen



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



## Entwicklung Fluoreszenz-generierender und Auxiliar-vermittelter Peptidligationen





# Entwicklung Fluoreszenz-generierender und Auxiliar-vermittelter Peptidligationen

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm GAUSS

der Georg-August University School of Science

vorgelegt von

**Swantje Nawratil**

aus Kassel

Göttingen 2017



## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2018

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2017

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2018

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2018

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9770-7

eISBN 978-3-7369-8770-8



### **Betreuungsausschuss**

Prof. Dr. Ulf Diederichsen

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Konrad Koszinowski

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen

### **Mitglieder der Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. Ulf Diederichsen

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen

Korreferent: Prof. Dr. Konrad Koszinowski

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen

### **Weitere Mitglieder der Prüfungskommission**

Prof. Dr. Hartmut Laatsch i.R.

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Claudia Steinem

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen

Dr. Franziska Thomas

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen

Dr. Michael John

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen

**Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2017**





Diese Arbeit wurde vom Schwerpunktprogramm SPP1623 „Chemoselektive Reaktionen für die Synthese und Anwendung funktionaler Proteine“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert und wurde unter der Aufsicht von Prof. Dr. Ulf Diederichsen am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen von April 2013 bis August 2017 durchgeführt.

Ich danke Prof. Dr. Ulf Diederichsen für die Möglichkeit, an diesem interessanten und herausfordernden Thema zu arbeiten, für seine Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und die mir gewährte wissenschaftliche Freiheit.





*„Siehst du, Momo“, sagte er dann zum Beispiel, „es ist so: Manchmal hat man eine sehr lange Straße vor sich. Man denkt, die ist so schrecklich lang; das kann man niemals schaffen, denkt man.“ [...] „Man darf nie an die ganze Straße auf einmal denken, verstehst du? Man muss nur an den nächsten Schritt denken, an den nächsten Atemzug, an den nächsten Besenstrich. Und immer wieder nur an den nächsten.“ Wieder hielt er inne und überlegte, ehe er hinzufügte: „Dann macht es Freude; das ist wichtig, dann macht man seine Sache gut. Und so soll es sein.“*

M. Ende, *Momo*, Thienemann, Stuttgart, 15. Auflage **2016**.





# Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	1
II	Auxiliar-vermittelte Native Chemische Ligation.....	3
	1. Synthese von Peptiden und Proteinen.....	3
	2. Aufgabenstellung.....	11
	3. Variation der Thioester-Peptide.....	12
	4. Funktionalisierung von Cellulose-Nanopartikeln .....	15
III	PNA-vermittelte Ligation zur Synthese fluoreszierender Peptide .....	20
	1. Fluoreszenz-Markierung von Biomolekülen.....	20
	2. PNA-Oligomere als photoabspaltbare Template .....	26
	3. Aufgabenstellung.....	30
	4. Licht-induzierte 1,3-dipolare Cycloadditionen von Tetrazolen.....	32
	5. Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloadditionen eines Coumarin-Derivates.....	54
IV	Zusammenfassung und Ausblick .....	80
V	Summary and Outlook.....	84
VI	Experimente .....	87
	1. Methoden und Arbeitstechniken .....	87
	2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) .....	89
	3. Synthese der Bausteine .....	97
	4. Synthese funktionalisierter Peptide .....	117
	5. Funktionalisierte PNA-Oligomere.....	153
	6. PNA/Peptid-Hybride .....	158
	7. Licht-induzierte 1,3-dipolare Cycloadditionen .....	165
	8. Click-Reaktionen Coumarin-funktionalisierter Peptide .....	170
	9. Synthese Coumarin-funktionalisierter PNA/Peptid-Hybride .....	173
VII	Abkürzungsverzeichnis .....	177
VIII	Literaturverzeichnis.....	180
IX	Danksagung .....	189





## I Einleitung

Das Überleben in den Tiefen des offenen Ozeans stellt große Herausforderungen an die dort lebenden Spezies, ist es doch eine Umgebung ohne Verstecke oder Sonnenlicht.<sup>[1]</sup> Im Laufe der Evolution entwickelten daher viele der dort lebenden Organismen eine Strategie, die ihnen das Überleben sicherte: Biolumineszenz – Licht, das durch eine chemische Reaktion erzeugt wird, und in den Tiefen des Ozeans bei der Erfüllung grundlegender Bedürfnisse hilft.<sup>[2]</sup> In allen Ozeanen der Erde finden sich biolumineszente Lebewesen; Garnelen, Kalmare, Quallen, Krebstiere und besonders Fische setzen Biolumineszenz ein.<sup>[3]</sup> Biolumineszenz hilft bei der Nahrungssuche oder der Suche nach einem geeigneten Partner, am häufigsten dient sie jedoch der Verteidigung gegenüber Fressfeinden.<sup>[1,2]</sup> Während einige Lebewesen Licht-emittierende Chemikalien ausstoßen, um ihre Feinde zu blenden oder zu verwirren, markieren andere ihre Feinde mit einem lumineszenten Schleim, sodass sie zur leichten Beute für Raubtiere werden.<sup>[1]</sup> So wie die Natur Biolumineszenz zur Eroberung der Tiefsee einsetzt, so machen sich auch Wissenschaftler Fluoreszenz zunutze, um einen immer tieferen Einblick in biologische Systeme zu erhalten. Fluorophore – Moleküle, deren Anregung durch Bestrahlung zur spontanen Emission von Licht führt – spielen eine fundamentale Rolle in der modernen Wissenschaft und ermöglichen die genaue Beobachtung biologischer Prozesse.<sup>[4,5]</sup> So dient die Markierung eines Biomoleküls mit einem Fluorophor der Strukturaufklärung, der Aufklärung von Enzymmechanismen und Wechselwirkungen zwischen Molekülen und erlaubt die Verfolgung eines Biomoleküls in Echtzeit.<sup>[6]</sup> Die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) revolutionierte die Fluoreszenz-Markierung von Biomolekülen und führte zur Entwicklung einer Reihe neuer Techniken, die die Fluoreszenz von GFP ausnutzen und oft zum ersten Mal die Beobachtung von Biomolekülen *in vivo* ermöglichten.<sup>[7-9]</sup> GFP und seine Weiterentwicklungen wurden zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Biochemie und Medizin, wo sie zur Erforschung unterschiedlichster Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Malaria, Krebs oder Aids eingesetzt wurden.<sup>[10]</sup> Die Markierung durch GFP ist jedoch nur bei Biomolekülen möglich, die genetisch modifiziert werden können, Lipide oder Polysaccharide können mithilfe von GFP nicht markiert werden.<sup>[11]</sup> Die Entwicklung von Methoden zur selektiven Funktionalisierung dieser Moleküle mit Fluorophoren ist daher von großer Bedeutung, um ein vollständiges Verständnis von komplexen biologischen Systemen zu erhalten. Im Labor ist es durch die präzise Kontrolle der Reaktionsbedingungen möglich, organische Moleküle



selektiv zu synthetisieren, in Zellen oder anderen biologischen Systemen sind jedoch unzählige Moleküle vorhanden, deren funktionelle Gruppen mit einem Fluorophor reagieren können.<sup>[11,12]</sup> Besondere Aufmerksamkeit kommt hier den Peptiden und Proteinen zu, die in allen lebendigen Organismen fundamentale Aufgaben übernehmen: als Antikörper sind sie Teil des Immunsystems, als Enzyme katalysieren sie wichtige Stoffwechselfunktionen, und als Rezeptoren dienen sie der Signaltransduktion.<sup>[13,14]</sup> Die Aufklärung der diversen Proteinfunktionen macht die selektive Markierung des Proteins mit einem Fluorophor notwendig. Proteine können zwar mithilfe gentechnischer Verfahren mit GFP markiert werden, diese Funktionalisierung ermöglicht jedoch nicht die Aufklärung der post-translationalen Modifikationen, die der Schlüssel ihrer Funktion sind.<sup>[11,15]</sup> Dies macht die Entwicklung neuer Methoden zur Synthese und selektiven Funktionalisierung von Peptiden und Proteinen notwendig. Im ersten Teil dieser Arbeit soll daher ein im Arbeitskreis DIEDERICHSEN entwickeltes Auxiliar zur Synthese und Funktionalisierung von Peptiden eingesetzt werden, während im zweiten Teil die Fluoreszenz-Markierung von Peptiden mithilfe bioorthogonaler Reaktionen durchgeführt werden soll.



## II Auxiliar-vermittelte Native Chemische Ligation

### 1. Synthese von Peptiden und Proteinen

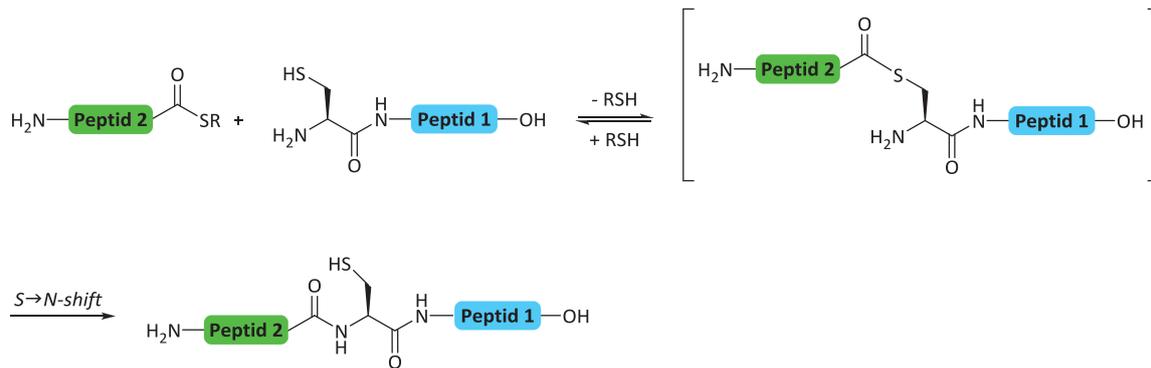
Die Funktionen von Peptiden in Organismen lassen sich auf vergleichsweise wenige Bereiche reduzieren, Proteine dagegen besitzen außerordentlich vielfältige Funktionen und bilden einen elementaren Bestandteil des Lebens auf unserem Planeten. Im Organismus übernehmen Proteine Struktur- und Gerüstfunktionen, dienen der Infektionsabwehr und Signalübertragung, und katalysieren als Enzyme nicht zuletzt unterschiedlichste Stoffwechselreaktionen.<sup>[14]</sup> Die biologische Funktion der Proteine wird durch ihre Struktur und Aminosäuresequenz bestimmt.<sup>[16]</sup> Studien zeigten, dass eine einzelne Zelle mehr als 20 000 Genbereiche enthält, die die Aminosäuresequenz eines Proteins codieren, und bis zu 100 000 verschiedene Proteine exprimieren kann.<sup>[14]</sup> Um die mannigfaltigen Funktionen, die Peptide und Proteine in der belebten Natur übernehmen, zu verstehen, haben Generationen von Wissenschaftlern an der Strukturaufklärung eben jener Proteine gearbeitet. Die Strukturaufklärung eines Biomoleküls erfordert zuallererst seine Isolierung oder Synthese, eine Aufgabe, die angesichts der Größe von Proteinen eine besondere Herausforderung darstellt: Einige in der Natur vorkommende Proteine bestehen aus Polypeptidketten mit bis zu 300 Aminosäuren.<sup>[16]</sup>

In den vergangenen Jahrzehnten wurden unterschiedlichste Methoden zur chemischen Synthese von Peptiden und Proteinen entwickelt. Den Grundstein der chemischen Peptidsynthese legten CURTIUS<sup>[17,18]</sup> und FISCHER<sup>[19]</sup>, die in ihren Arbeiten die ersten Dipeptide synthetisierten.<sup>[20]</sup> Die Pionierarbeiten von FISCHER und anderen gipfelten in der Synthese des Hormons Oxytocin durch VIGNEAUD *et al.*, für die er 1955 den Nobelpreis für Chemie erhielt.<sup>[21,22]</sup> Oxytocin besteht jedoch aus nur neun Aminosäuren, und so wurden in den folgenden Jahren die Methoden zur organischen Synthese von Peptiden und Proteinen weiter verfeinert, sodass auch die Synthese menschlichen Insulins (51 Aminosäuren) und des Enzyms Ribonuclease A (124 Aminosäuren) erreicht werden konnte.<sup>[16,23]</sup> Die Synthese von Peptiden und Proteinen mithilfe klassischer organischer Chemie ist jedoch beschränkt. Während der Aktivierung der  $\alpha$ -Carbonsäure kann es zur Racemisierung der C-terminalen Aminosäure kommen, viele vollständig geschützte Peptide sind schlecht löslich und ihre Reinigung und Charakterisierung sind schwierig.<sup>[16]</sup> Ein weiterer Meilenstein war daher die

Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) durch MERRIFIELD, eine Methode, die die Synthese von Peptiden mithilfe eines standardisierten Verfahrens erlaubt.<sup>[24]</sup> Gleichwohl die Entwicklung der SPPS die Synthese von Peptiden erleichterte, war es auch weiterhin schwierig, Peptide, deren Sequenz mehr als 50 Aminosäuren enthält, zu synthetisieren.<sup>[16,20]</sup> Die Verwendung gentechnischer Methoden kann zur Synthese größerer Peptide verwendet werden, allerdings ist diese Technik auf Proteine beschränkt, deren Sequenz aus den zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren besteht, und post-translationale Modifikationen können nur mit großem Aufwand eingeführt werden.<sup>[13,16]</sup> Die chemische Synthese größerer Peptide bzw. Proteine kann auf zwei Wegen erreicht werden: Kupplung und nachfolgende Entschützung zweier geschützter Peptidfragmente sowie die chemoselektive Ligation zweier nicht-geschützter Peptidfragmente.<sup>[25]</sup>

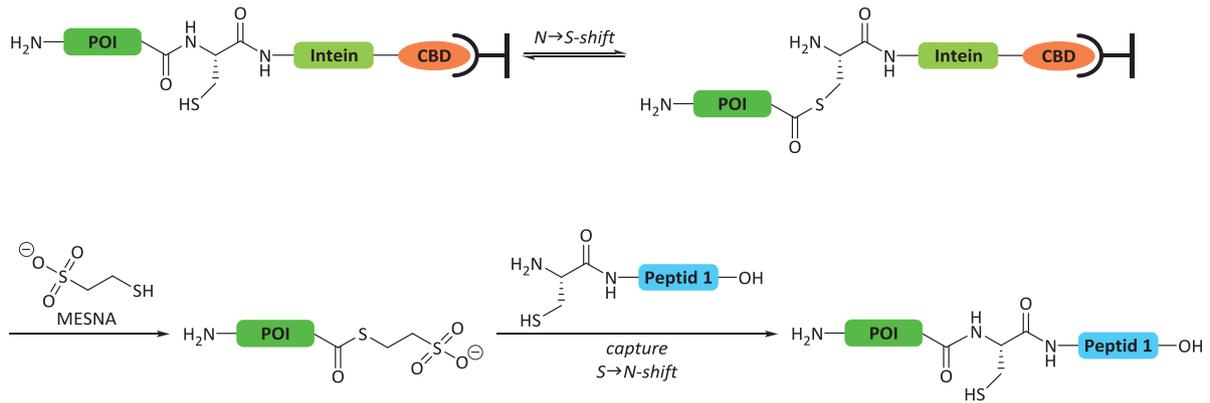
### 1.1. Ligationsmethoden

Die chemoselektive Ligation zweier Peptidfragmente kann mithilfe unterschiedlicher Methoden erfolgen. Eine der bekanntesten ist die Native Chemische Ligation (NCL), die auf Experimente von WIELAND *et al.* zurückgeht und 1994 von KENT *et al.* zum ersten Mal für die chemoselektive Ligation zweier nicht-geschützter Peptidfragmente eingesetzt wurde.<sup>[26,27]</sup> Bei der Nativen Chemischen Ligation reagieren ein elektrophiler Thioester am C-Terminus eines N-terminalen Peptides und die nucleophile Thiol-Gruppe eines N-terminalen Cysteins miteinander unter Bildung einer nativen Peptidbindung (Schema II.1). Zunächst erfolgt der *capture*-Schritt, der reversible Thiol-Thioester-Austausch, gefolgt von einer schnellen intramolekularen Umlagerung, dem *S*→*N*-*shift* des Cystein-Thioesters, der über einen begünstigten fünfgliedrigen Übergangszustand verläuft.<sup>[16,25]</sup> Cysteine, die nicht am Ende, sondern inmitten der Peptidsequenz lokalisiert sind, können zwar einen Thiol-Thioester-Austausch eingehen, bilden sich jedoch schnell zurück, da die irreversible Umlagerung nur an N-terminalen Cysteinen erfolgen kann.<sup>[25]</sup>



**Schema II.1.** Mechanismus der Nativen Chemischen Ligation.<sup>[25]</sup>

Die Synthese von großen Proteinen, die nicht mithilfe von SPPS und NCL hergestellt werden können, kann durch Protein-Semisynthese erfolgen.<sup>[25]</sup> Die Protein-Semisynthese vereint die Vorteile biochemischer und organischer Synthese und ermöglicht die Ligation chemisch hergestellter Peptid-Thioester mit rekombinanten Proteinen. Dies erlaubt die Einführung unnatürlicher Aminosäuren oder die Fluoreszenz-Markierung des rekombinanten Peptides durch die Ligation mit einem entsprechend funktionalisierten Thioester.<sup>[28,29]</sup> Die Weiterentwicklung der Protein-Semisynthese ist die *expressed protein ligation* (EPL).<sup>[30]</sup> EPL macht sich den Prozess des Proteinspleißens, bei dem ein Intein genanntes Proteinfragment aus dem Protein herausgeschnitten wird, für die Semisynthese eines Thioesters zunutze.<sup>[25]</sup> Im ersten Schritt wird mithilfe gentechnischer Methoden ein *protein of interest* (POI) mit einem Intein verbunden, das zur leichteren Reinigung mit einem Affinitäts-Tag wie einer Chitinbindungsdomäne (CBD) verknüpft ist (Schema II.2).<sup>[25]</sup> Das Intein katalysiert den reversiblen *N*→*S*-shift. Nachfolgend kann der gewünschte Protein-Thioester durch Zugabe eines Thiols erzeugt werden. Hierfür wird u.a. Natrium-2-sulfanylethansulfonat (MESNA) verwendet. Der Thioester kann leicht durch Waschen vom Intein abgetrennt werden und nachfolgend in einer NCL eingesetzt werden (Schema II.2).



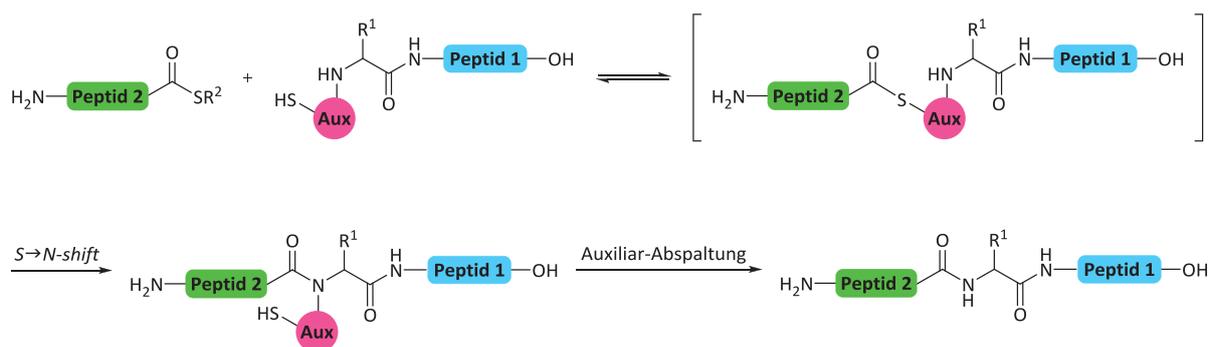
**Schema II.2.** Konzept der *expressed protein ligation*.<sup>[25]</sup>

Die Native Chemische Ligation und ihre Weiterentwicklungen wie die EPL oder das *trans*-Proteinspleißen<sup>[31,32]</sup> ermöglichten die Synthese von unterschiedlichsten Proteinen. So konnte das menschliche Enzym Lysozym mithilfe einer Nativen Chemischen Ligation synthetisiert werden. Seine Polypeptidkette besteht aus 130 Aminosäuren, darunter acht Cysteine, was die Synthese des Enzyms aus vier Peptidsegmenten ermöglichte.<sup>[33]</sup> KENT *et al.* synthetisierten eine Dimer-Form der HIV-1 Protease, ein Protein, das 203 Aminosäuren enthält, und zeigten, dass auch das synthetisch hergestellte Protein enzymatisch aktiv war.<sup>[34]</sup> Der größte Nachteil der Nativen Chemischen Ligation ist jedoch die Notwendigkeit des Vorhandenseins eines Cysteins im Peptid, natürlich vorkommende Peptide oder Proteine enthalten in ihrer Aminosäuresequenz jedoch nur 1.7 % Cystein.<sup>[35]</sup> Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, um Ligationen ohne Cystein durchzuführen. Eine Möglichkeit ist die Ligation mithilfe weiterer Aminosäuren, so wurden sowohl Histidin als auch die seltene Aminosäure Selenocystein in Nativen Chemischen Ligationen eingesetzt.<sup>[25]</sup> Weiterhin ist es möglich, das Produkt einer Nativen Chemischen Ligation zu modifizieren oder unter Einsatz von Raney-Nickel oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) zu desulfurisieren, was die Generierung von Alanin an der Ligationsstelle erlaubt.<sup>[25,36]</sup>



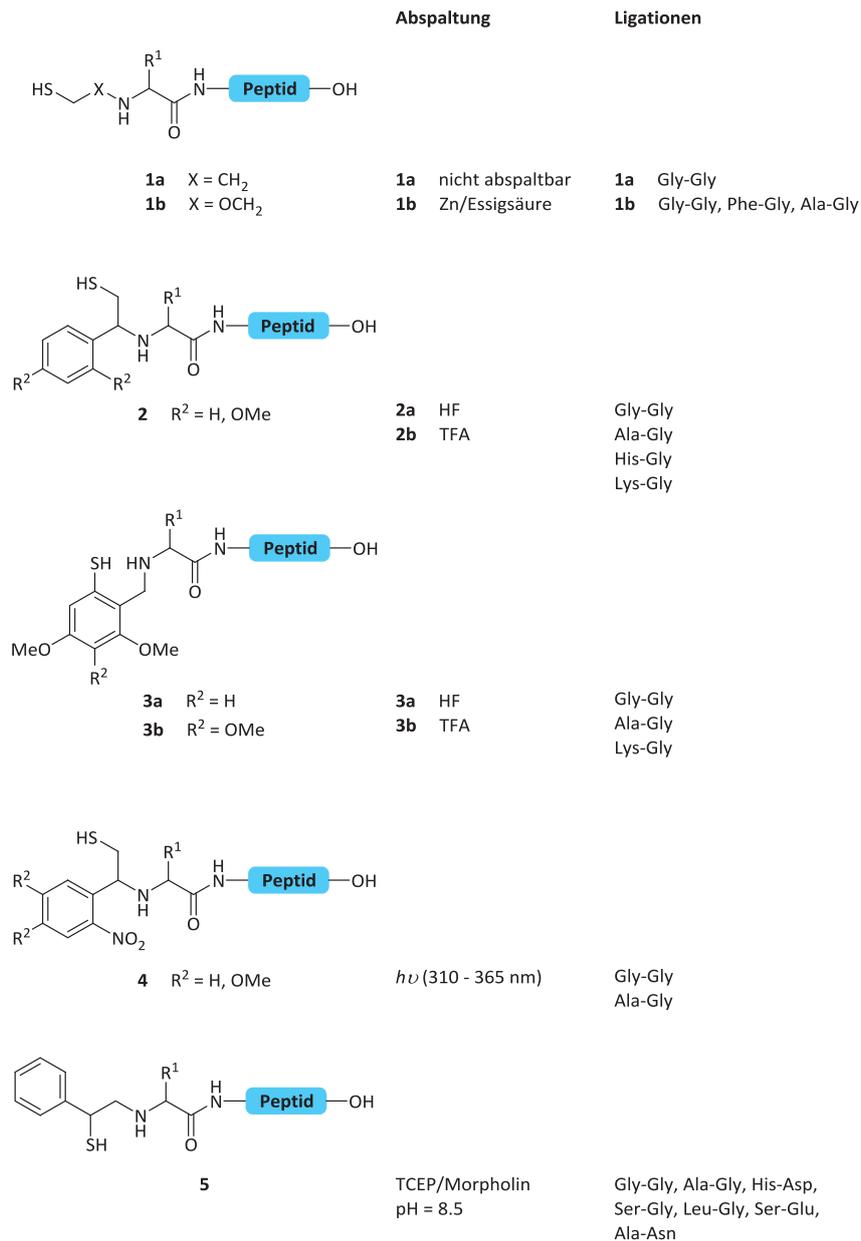
## 1.2. Auxiliare für die Native Chemische Ligation

Herkömmliche Methoden zur Nativen Chemischen Ligation benötigen ein Cystein an der Ligationsstelle. Zur Ligation Cystein-freier Peptide wurden Thiol-haltige Auxiliare entwickelt, die am *N*-Terminus eines *C*-terminalen Peptides angebracht werden und die Rolle des Cysteins übernehmen (Schema II.3).<sup>[25,37]</sup>



**Schema II.3.** Mechanismus der Auxiliar-vermittelten Nativen Chemischen Ligation.  $R^1$  = Seitenkette der Aminosäure;  $R^2$  = Alkyl-, Aryl-Rest; Aux = Auxiliar.<sup>[25]</sup>

Eines der ersten Auxiliare, das in einer Nativen Chemischen Ligation eingesetzt wurde, war Ethanthiol-Auxiliar **1a** bzw. Oxyethanthiol-Auxiliar **1b** (Abbildung II.1), wobei letzteres jedoch geringere Ausbeuten lieferte.<sup>[38]</sup> DAWSON *et al.* synthetisierten Auxiliar **2** (Abbildung II.1), das eine Aryl-Gruppe an der 1-Position besitzt und Ligationen mit den sterisch wenig anspruchsvollen Aminosäuren Glycin und Alanin erlaubt, jedoch nur unter stark sauren Bedingungen mithilfe von HF oder Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*, TFA) vom Peptid abgespalten werden kann.<sup>[39]</sup> Auxiliar **3a** besitzt ein 2-Mercaptobenzyl-Grundgerüst und wurde 2000 von DAWSON und OFFER entwickelt (Abbildung II.1).<sup>[40]</sup> Das elektronenreiche Arylthiol kann einen Thioester-Austausch mit einem *C*-terminalen Peptid-Thioester eingehen und nach der Ligation durch TFA abgespalten werden. Weitere Studien zeigten, dass Auxiliar **3a** durch die Einführung zusätzlicher Methoxy-Gruppen eine erhöhte Nucleophilie aufwies und das tertiäre Amin nach der Ligation stärker säurelabil war,<sup>[41]</sup> sodass Auxiliar **3b** u.a. zur Synthese von Cytochrom b562, einem Peptid mit 106 Aminosäuren, eingesetzt werden konnte.<sup>[42]</sup>



**Abbildung II.1.** Auxiliare für die Native Chemische Ligation. R<sup>1</sup> = Seitenkette der Aminosäure.<sup>[25,43]</sup>

Alle diese Auxiliare werden unter relativ harten Bedingungen vom Peptid abgespalten oder können, wie im Falle des Ethanthiol-Auxiliars **1a**, nicht abgespalten werden. Die Abspaltung eines Auxiliars sollte jedoch unter möglichst milden Bedingungen erfolgen, um die Zersetzung des Peptides zu vermeiden. AIMOTO<sup>[44]</sup> und MARINZI<sup>[45]</sup> entwickelten daher Auxiliar **4**, dessen *ortho*-Nitrobenzol-Gruppe die Photoabspaltung des Auxiliars ermöglicht (Abbildung II.1). BECKER *et al.* synthetisierten 2015 eine modifizierte Version des photoabspaltbaren Auxiliars, bei der eine Methoxy-Gruppe durch eine Polyethylenglycol-Kette (PEG) ausgetauscht wurde, und verwendeten dies zur Synthese glycosylierter Peptide.<sup>[46]</sup>