

NMR-spektroskopische Untersuchungen von Protein-Ligand-Interaktionen und zeit- aufgelöste, NMR-spektroskopische Unter- suchungen enzymatischer Reaktionen mit Progresskurvenanalytik

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Moritz Fölsing

aus Hamburg

Tag der Disputation 05.05.2023

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Stark

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit Juli 2013 bis Januar 2017 am Institut für Organische Chemie im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. C. Stark, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer und Dr. Thomas Hackl danke ich für die interessante Themenstellung und für die stets freundliche und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Stark danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure(n)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CMP-Sia	Cytidin-5'-monophosphat-Neuraminsäure
ConA	Concanavalin A
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>Diisopropylamin</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleinacid</i>)
esgp	excitation sculpting using gradient pulses
ESI	electronspray ionisation
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FUT	Fucosyltransferase
Gal	Galaktose
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GMP	Guanosinmonophosphat
IR	Infrarot
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllactosamin
LsLa	hämolytischen Lectins aus <i>Laetiporus sulphreus</i>
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
Man	Mannose
MD	Moleküldynamik (<i>molecular dynamic</i>)

MS	Massenspektrometrie
MST	Thermophorese im Mikromaßstab (<i>Microscale Thermophoresis</i>)
NAc	<i>N</i> -Acetyl
NMR	nuclear magnetic resonance
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuranyl-5-sulfonyl
PDB	Protein Data Bank
POFUT1	GDP-Fucose Protein <i>O</i> -Fucosyltransferase 1
ROESY	rotating-frame NOE spectroscopy
RP	reversed phase
rpm	revolutions per minute
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
Set8	humane Methyltransferase SET8 (auch PR-Set7)
SPR	Plasmonenoberflächenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
ST6Gal I	β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1
STD	saturation transfer difference
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Tetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TMPS	Trimethylsilylpropionat
TOCSY	total correlation spectroscopy
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
UV	Ultraviolett

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	7
2	Abstract.....	9
3	Einleitung.....	11
3.1	Enzyme.....	11
4	Methoden.....	15
4.1	Peptidsynthese.....	15
4.2	Saturation Transfer Difference NMR-Spektroskopie.....	16
4.3	Quantitative NMR.....	19
4.4	Thermophorese im Mikromaßstab.....	21
5	NMR-Spektroskopische Untersuchungen der Methyltransferase Set8.....	25
5.1	Histone.....	25
5.2	Methyltransferase SET8.....	27
5.3	Aufgabenstellung.....	29
5.4	Ergebnisse und Diskussion.....	30
5.4.1	Synthese des Peptids RHRAVL.....	30
5.4.2	Synthese des Peptids RHRKVL.....	34
5.4.3	Synthese des Peptids RHRKVLRD.....	37
5.4.4	Synthese des Peptids AKRHRKVLRD.....	39
5.5	Bindungsstudien.....	40
5.5.1	Untersuchung der Bindung der Peptide RHRKVL und RHRAVL an die Methyltransferase Set8.....	40
5.5.2	Untersuchung der Bindung des Peptids RHRKVLRD an die Methyltransferase Set8.....	44
5.6	Kinetische Untersuchung der Methyltransferase SET8.....	47
5.6.1	Umsetzung des Peptids AKRHRKVLRD durch die Methyltransferase SET8.....	49
5.6.2	Umsetzung des Peptids RHRKVLRD durch die Methyltransferase SET8.....	50
5.6.3	Umsetzung des Peptids RHRKVL durch die Methyltransferase SET8.....	51
5.6.4	Inhibition der Umsetzung des Peptids RHRKVL durch die Methyltransferase SET8 durch das Analogon RHRAVL.....	52
5.6.5	Einfluss der Kettenlänge der Liganden auf die Bindungsstärke und Reaktionsgeschwindigkeit.....	54
6	<i>In-Silico</i> Modeling und kinetische Charakterisierung der humanen Fucosyltransferase 2 mittels NMR-Spektroskopie.....	55
6.1	Fucosyltransferasen.....	55
6.2	Aufgabenstellung.....	57

6.3 Ergebnisse und Diskussion	58
6.3.1 Erstellung eines Modells der FUT2 Struktur	58
6.3.2 Energieminimierung des Protein-Ligand-Komplexes	65
6.3.3 Charakterisierung der kinetischen Eigenschaften von FUT2 mittels NMR-Spektroskopie und Progresskurvenanalytik	71
7 Charakterisierung der enzymatischen Sialylierung durch humane β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1 (ST6Gal I)	75
7.1 Sialyltransferasen.....	75
7.2 Aufgabenstellung.....	77
7.3 Ergebnisse und Diskussion	78
7.3.1 Erstellung eines Modells der Bindung von CMP-Sia an ST6Gal1 und Erstellung einer Moleküldynamiksimulation	78
7.3.2 Untersuchung der Umsetzung von <i>N</i> -Acetyllactosamin durch die Sialyltransferase ST6Gal1	82
7.3.3 Untersuchung der Bindung der natürlichen Liganden <i>N</i> -Acetyllactosamin und CMP-Sia an die Sialyltransferase ST6Gal1	85
8 Evaluation von multivalenten Neoglycokonjugaten auf Basis von Adamantan	89
8.1 Multivalenz.....	89
8.2 Aufgabenstellung.....	90
8.3 Ergebnisse und Diskussion	91
9 Experimenteller Teil.....	98
9.1 Expression in <i>Escherichia coli</i> Zellen und Reinigung von Set8-Protein	101
9.1.1 Transformation der DNA und Erstellen der Zellkultur.....	101
9.1.2 Extraktion und Reinigung von Set8	101
9.1.3 Extraktion und Reinigung von DNA	102
9.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Peptidsynthese.....	103
9.2.1 Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield	103
9.2.2 Fmoc-Abspaltung und Bestimmung der Rohausbeute mittels UV-Spektroskopie	103
9.2.3 Abspaltung vom Harz und Entschützung der Seitenketten.....	103
9.2.4 Etherextraktion.....	104
9.2.5 Reinigung mittels RP-HPLC.....	104
9.2.6 Probenpräparation und NMR-Messungen zur Charakterisierung.....	104
9.3 Synthese des Peptids RHRAVL	105
9.4 Synthese des Peptids RHRKVL	108
9.5 Synthese des Peptids RHRKVLRD.....	111
9.6 Synthese des Peptids AKRHRKVLRD	113
9.7 STD-Titrationsen.....	114

9.7.1 STD-Titration verschiedener Peptide in Anwesenheit der Methyltransferase Set8	114
9.7.1.1 STD-Titration des Peptids RHRAVL in Anwesenheit der Methyltransferase Set8	115
9.7.1.2 STD-Artefakte des Peptids RHRAVL	115
9.7.2.1 STD-Titration des Peptids RHRKVL in Anwesenheit der Methyltransferase Set8	116
9.7.2.2 STD-Artefakte des Peptids RHRKVL	116
9.7.3.1 STD-Titration des Peptids RHRKVLRD in Anwesenheit der Methyltransferase Set8	117
9.7.3.2 STD-Artefakte des Peptids RHRKVLRD	117
9.7.4.1 STD-Titration N-Acetyllactosamin in Anwesenheit der β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1	118
9.7.3.2 STD-Titration Cytidin-5'-monophosphat-Neuraminsäure in Anwesenheit der β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1	119
9.7.4 STD-Titrationen verschiedener Kohlenhydratverbindungen auf Grundlage der Mannose in Anwesenheit des Lectins Concanavalin A	120
9.7.4.1 STD-Titration von α -1-O-Methylmannosid	120
9.7.4.2 STD-Titration Neoglycokonjugat A	121
9.7.4.3 STD-Titration Neoglycokonjugat B	122
9.8 Enzymkinetische Messungen	123
9.8.1.1 Umsetzung des Peptids RHRKVL durch die Methyltransferase Set8	123
9.8.1.2 Umsetzung des Peptids RHKKVL in Anwesenheit des Inhibitors RHRAVL durch die Methyltransferase Set8	123
9.8.1.3 Umsetzung des Peptids RHRKVLRD durch die Methyltransferase Set8	124
9.8.1.4 Umsetzung des Peptids AKRHRKVLRD durch die Methyltransferase Set8	124
9.8.2 Umsetzung von N-acetyl-3-O- β -D-galactopyransoyl- β -D-galactosamin-methylglycosid durch die Fucosyltransferase2	124
9.8.3 Sialylierung von N-Acetyllactosamin durch die β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1	125
9.9 Toxikologische Daten	126
Tabelle 30: Sicherheitsdaten der verwendeten Chemikalien	126
10 Literaturverzeichnis	129
11 Danksagung	136
12 Eidesstattliche Erklärung	137

1 Zusammenfassung

Histone stellen einen wichtigen Baustein zur Packung der DNA dar. Durch Modifikationen der Seitenketten verschiedener Aminosäuren wird die Packung der DNA kontrolliert. Die Methylierung des Lysin-20 des Histons 4 durch die Methyltransferase Set8 ist einer dieser Mechanismen und spielt für die fehlerfreie Zellteilung eine wichtige Rolle.

Die Untersuchung der enzymatischen Methylierung mehrerer kurzer Ausschnitte des Histons 4 zeigte, dass alle Peptide mit dem minimalen Bindungsmotiv umgesetzt wurden. Es konnte lediglich eine Verlangsamung mit steigender Kettenlänge beobachtet werden. Alle Ergebnisse konnten jeweils anhand einer einzigen Reaktionsverfolgung durch NMR-Spektroskopie und Progresskurvenanalytik mittels der Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung, welche die Lambert-W-Funktion nutzt, ermittelt werden. So wurde für das Peptid RHRKVL ein $K'_M = 261 \pm 12 \mu\text{M}$, für das Peptid RHRKVLRD ein $K'_M = 329 \pm 23 \mu\text{M}$ und für das Peptid AKRHRKVLRD ein $K'_M = 523 \pm 250 \mu\text{M}$ bestimmt. Ferner konnte mit dem Peptid RHRAVL, bei dem das zu methylierende Lysin durch ein Alanin ersetzt wurde, eine erfolgreiche Inhibition durchgeführt werden. Es wurde eine Inhibitionskonstante von $K_I = 58 \mu\text{M}$ für die Umsetzung des sehr ähnlichen Peptids RHRKVL bestimmt.

Die Fucosyltransferase 2 (FUT2) ist an der Bildung verschiedener Oligosaccharide beteiligt. Dazu gehören auch Oligosaccharide mit den Lewismotiven Le^y und sLe^y , welche eine wichtige Rolle im Leukozytenkreislauf und bei der Wechselwirkung von Zellen mit Krankheitserregern spielen. Überexpression von sLe^x , sLe^y und anderen fucosylierten Glykanen wird bei Entzündungen und im Verlauf verschiedener Krebserkrankungen beobachtet. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, dass FUT2 ein mögliches Ziel für therapeutische Ansätze sein kann.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren keine Strukturdaten für FUT2 bekannt. Auf Grundlage von Homologiemodellen wurde eine mögliche Struktur und der Interaktion mit den natürlichen Substraten GDP-Fucose und LacNAc für FUT2 *in silico* erstellt. Dies ist ein möglicher Ansatz für weitere Studien und strukturbasiertes Design für mögliche Inhibitoren. Ferner wurden mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie und anschließender Progresskurvenanalyse die kinetischen Parameter $K_M'_{\text{Akzeptor}} = 613 \pm 121 \mu\text{M}$ und $v_{\text{max}}' = 1.7 \pm 0.4 \text{ nM/s}$ der natürlichen Substrate von FUT2 ermittelt.

Neuraminsäurehaltige Glykane sind an verschiedenen molekularen Interaktionen wie Zell-Zell-Adhäsion, Befruchtung, Blutgerinnung sowie Immunreaktionen beteiligt. Sialyltransferasen katalysieren beim Aufbau der komplexen Glykane die Übertragung des Sialylrestes von

Cytidin-5'-monophosphat-Neuraminsäure auf einen Kohlenhydratakzeptor. Die Sialyltransferasen unterscheiden sich dabei in der Selektivität des Akzeptors und der katalysierten Verknüpfung. ST6Gal I katalysiert eine Verknüpfung des Sialylrestes an die 6-OH-Gruppe einer endständigen Galaktose.

Die Bindung der Substrate an ST6Gal I wurden mittels STD-NMR-Experimenten untersucht. Es konnte für das Akzeptorsubstrat *N*-Acetyllactosamin eine Dissoziationskonstante von $K_D = 577 \pm 188 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Für das Donorsubstrat Cytidin-5'-monophosphat-Neuraminsäure wurde eine Dissoziationskonstante von $K_D = 4.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ermittelt. Ferner wurde für das Donorsubstrat anhand der Intensität der STD-Signale ein Bindungsepitop erstellt.

Kinetische Untersuchungen des enzymatischen Transfers der Sialylgruppe auf *N*-Acetyllactosamin wurden mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie und anschließender Progresskurvenanalytik unter Verwendung der integrierten Lösung der Michaelis-Menten-Gleichung mit der Lambert-W-Funktion durchgeführt. Es konnte eine apparente Michaelis-Menten-Konstante von $K'_{M, \text{CMP-5NeuAc}} = 333 \pm 5 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen spielen bei diversen biologischen Prozessen eine Rolle und sind deshalb auch von großer Interesse für die Entwicklung von Wirkstoffen. Multivalente Kohlenhydratstrukturen sind bereits regelmäßig zur Untersuchung dieser Interaktionen eingesetzt worden.

Adamantan bietet ein gutes Gerüst für ein trimeres Kohlenhydratkonjugat mit der Möglichkeit einer vierten, unabhängigen Funktionalisierung. Es wurden Mannosekonjugate mit unterschiedlich langen Ethylenspacern untersucht. Mittels STD-NMR-Spektroskopie konnte ein $K_{D, \text{sol}} = 280 \pm 47 \mu\text{M}$ für ein Konjugat mit einfacher und $K_{D, \text{sol}} = 177 \pm 56 \mu\text{M}$ mit dreifacher Spacerlänge bestimmt werden, welche nur etwas besser als der des vergleichbaren Mannosemonomers war. Durch Funktionalisierung der vierten Adamantanecke mit einem Fluoreszenzfarbstoff konnte mittels eines Oberflächenfluoreszenzessays ein $K_{D, \text{surf}} = 9.04 \pm 6.41 \mu\text{M}$ für das Trimer mit einfacher Spacerlänge und $K_{D, \text{surf}} = 0.51 \pm 0.23 \mu\text{M}$ für das Trimer mit dreifacher Spacerlänge bestimmt werden. Diese liegen deutlich unter dem vergleichbaren Monomer und zeigen das Potential von funktionalisiertem Adamantan als multivalentem Binder für Oberflächenproteine.

2 Abstract

Histones play an important role in DNA-packaging. The interactions between DNA and histones are controlled by modifications of the amino acid sidechains of the histones. The mono-methylation of lysine-20 of histone 4 is controlled by the methyltransferase Set8 and plays an important role for error-free cell division.

Various short fragments of the amino acid chain of histone 4 containing the minimal bindingmotive for the interaction with Set8 all showed to be methylated by Set8. The observed reaction of shorter fragments was slightly faster than the reaction of longer fragments. These reactions were observed by time-resolved NMR-spectroscopy. Kinetic parameters could be obtained from a single reaction with progress-curve analysis and the solution of the integrated form of the Michaelis-Menten-equation using the Lambert-W-function. For the peptide RHRKVL a $K'_M = 261 \pm 12 \mu\text{M}$ was observed, for the peptide RHRKVLRD a $K'_M = 329 \pm 23 \mu\text{M}$, and for the peptide AKRHRKVLRD a $K'_M = 523 \pm 250 \mu\text{M}$. The peptide RHRAVL, where the lysine was replaced by an alanine, proved to be a valid inhibitor. In the reaction with RHRKVL an inhibition constant of $K_I = 58 \mu\text{M}$ was observed.

Fucosyltransferase 2 (FUT2) takes part in the biosynthesis of various oligosaccharides. This includes the synthesis of oligosaccharides with Lewis motives Le^y and sLe^y which are playing an important part in leucocyte trafficking and host-pathogen interactions. Overexpression of sLe^x and sLe^y and other fucosylated glycans has been linked to inflammatory processes and has been observed during the progression of various kinds of cancers. This makes FUT2 a possible target for therapies.

At the time of this work there were no crystal structures or other structural data of FUT2 available. Based on an homology model a possible structure of FUT2 was designed. From this model, *in silico* studies about the interaction with the natural substrates of FUT2, GDP-fucose and LacNAc, were carried out. This finding represents a possible starting point for further studies and structure-based inhibitor design.

The kinetic parameters of the enzymatic transfer of fucose from GDP-fucose to LacNAc were analysed by timeresolved NMR-spectroscopy. Progress-curve analysis gave the kinetic parameters as $K'_M \text{Acceptor} = 613 \pm 121 \mu\text{M}$ and $v_{max}' = 1.7 \pm 0.4 \text{ nM/s}$.

Sialated glycans participate in various molecular interactions like cell-cell-adhesion, fertilisation, blood coagulation and immune reactions. The sialic acid is transferred to the glycans by specific sialyltransferases using cytidine-5'-monophosphate-sialic acid as sialyl donor. Sialyltransferases differ in selectivity of the acceptor substrate and in the position of the formed bond. St6Gal I catalyses the transfer of a sialyl moiety to the 6-OH position of a terminal galactose.

STD-NMR experiments were conducted to determine the binding of the natural acceptor substrate *N*-acetylglucosamine and the donor substrate cytidine-5'-monophosphate-sialic acid. For the acceptor substrate a dissociation constant of $K_D = 577 \pm 188 \mu\text{M}$ was determined. For the donor substrate a dissociation constant of $K_D = 4.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$ was determined. Furthermore, a binding epitope for the donor substrate was generated.

The enzymatic transfer of the sialyl moiety was analysed using time-resolved NMR-spectroscopy. Kinetic parameters could be obtained from a single reaction with progress-curve analysis and the solution of the integrated form of the Michaelis-Menten-equation using the Lambert-W-function. An apparent Michaelis-Menten-constant of $K'_{M, \text{CMP-5NeuAc}} = 333 \pm 5 \mu\text{M}$ was determined.

Interactions between carbohydrates and lectins can be found in various biological processes and are therefore of great interest for the development of new active components to treat diseases. Multivalent carbohydrate conjugates have been used regularly to study these interactions and often pose promising new agents.

Adamantane offers a stable frame for a trimeric carbohydrate functionalised conjugate. It further offers a fourth, independent position for further functionalisation. Here the binding of adamantyl conjugates to Concanavalin A (ConA) are analysed. The conjugates are functionalised with mannosyl moieties and different ethylene spacers. Using STD-NMR-spectroscopy, the dissociation constant in solution was determined for a conjugate with a single ethylene spacer as $K_{D, \text{sol}} = 280 \pm 47 \mu\text{M}$, and for a conjugate with triple spacer length as $K_{D, \text{sol}} = 177 \pm 56 \mu\text{M}$. These dissociation constants are only slightly lower than the dissociation constant of monomeric methyl-mannoside. By functionalising the fourth position of the adamantyl core with a fluorescence dye, the dissociation constant for surface bound ConA could be determined as $K_{D, \text{surf}} = 9.04 \pm 6.41 \mu\text{M}$ for a conjugate with single spacer length and $K_{D, \text{surf}} = 0.51 \pm 0.23 \mu\text{M}$ for a conjugate with triple spacer length. Those values are far below that of the methyl-mannoside and show the potential of functionalised adamantane as multivalent ligand for surface proteins.

3 Einleitung

3.1 Enzyme

Die Beschreibung der Synthese von Ethanol aus Glucose durch BUCHNER im Jahre 1878 durch die Zugabe eines zellfreien Hefeextraktes führte zur Entdeckung der Klasse der Enzyme (griechisch *en*: in; *zyme*: Hefe). SUMNER konnte durch die Kristallisation von Schwertbohnen-Urease beweisen, dass Enzyme zu den Proteinen gehören (1).

Enzymatisch katalysierte Reaktionen zeichnen sich durch sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten, milde Reaktionsbedingungen, hohe Substratspezifität und Regulationsmöglichkeiten aus. Die Unterteilung der Enzyme findet nach der Art der von ihnen katalysierten Reaktion statt. Jedem Enzym wird eine Klassifikationsnummer nach der „Enzyme Commission“ zugeordnet, die aus der Enzymklasse, der Gruppe und Untergruppe sowie einer willkürlich zugeordneten Seriennummer innerhalb der Untergruppe besteht (siehe Tabelle 1).

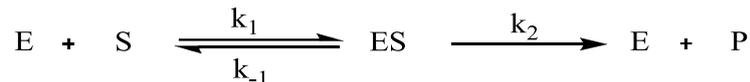
Tabelle 1: Enzymklassifizierung nach dem Reaktionstyp (1).

Klasse	Art der katalysierten Reaktion
1. Oxidoreduktasen	Oxidations-Reduktions-Reaktionen
2. Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen
3. Hydrolasen	Hydrolysereaktionen
4. Lyasen	Eliminierung von Gruppen unter Ausbildung von Doppelbindungen
5. Isomerasen	Isomerisierungen
6. Ligasen	mit ATP-Hydrolyse gekoppelte Knüpfung von Bindungen

Substrate lagern sich in den aktiven Zentren von Enzymen durch Wechselwirkungen mit der Enzymoberfläche in einer geometrisch günstigen Form für die katalysierte Reaktion an, wodurch die GIBB'sche Freie Energie (ΔG) reduziert wird. Die Funktion eines Enzyms kann durch die Blockade des aktiven Zentrums blockiert oder stark eingeschränkt werden. Viele Pharmazeutika sind auf die Blockade des aktiven Zentrums eines bestimmten Enzyms

zugeschnitten und können so eine ungewünschte Reaktion im Körper blockieren oder abschwächen.

Beobachtungen von WURTZ (1880) und O'SULLIVAN und TOMPSON (1890) lieferten die Erkenntnis, dass sich Enzyme mit ihren Substraten verbinden bevor eine Reaktion stattfinden kann (2). Die einfachste enzymatische Reaktion ist die Umsetzung eines Substrats (S) durch ein Enzym (E) in ein Produkt (P):



MICHAELIS und MENTEN entwickelten 1913 ein mathematisches Modell zur Beschreibung einer enzymatischen Reaktion (3). Das Modell beschreibt die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration und erlaubt die Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit v_{\max} und der Michaelis-Mentenkonstante K_m . BRIGGS und HALDANE erweiterten das Modell durch die Annahme eines quasistationären Zustands (*steady state*) für Konzentration des Enzymsubstratkomplexes. Durch diese Erweiterung wurde das Modell für alle enzymatischen Reaktionen anwendbar (4). Die so erweiterte Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt die Produktkonzentration über die Zeit der Reaktion. Dabei sind v_{\max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_M die Michaelis-Menten-Konstante, die sich aus den Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation k_1 , der Dissoziation k_{-1} und Wechselrate k_2 zusammensetzt.

$$\frac{d[P]}{dt} = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$v_{\max} = k_2[E]_0 \quad \text{und} \quad K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Formel 1: Nach BRIGGS und HALDANE erweiterte Michaelis-Menten-Gleichung. $[P]$ ist die Produktkonzentration, $[S]$ die Substratkonzentration, v_{\max} die Maximale Reaktionsgeschwindigkeit, K_M die Michaelis-Menten-Konstante bestehend aus den Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation k_1 und Dissoziation k_{-1} sowie der Wechselrate k_2 .

Die Kinetik enzymatischer Reaktionen kann durch unterschiedlichste Methoden charakterisiert werden. Diese Methoden können auf UV/Vis- oder Fluoreszenzspektroskopie, radiochemischen oder chromatographischen Verfahren oder der Messung der Leitfähigkeit, der Temperatur oder des Druckes basieren. Auch massenspektrometrische Methoden gewinnen immer mehr an Bedeutung. Für viele der Methoden ist allerdings eine Modifikation der Substrate oder weitere Umsetzung der Produkte in eine detektierbare Spezies nötig (2).

Die NMR-Spektroskopie spielte lange Zeit eine untergeordnete Rolle für die Untersuchung enzymatischer Reaktionen obwohl es möglich ist, die Konzentration der Produkte und Substrate über die gesamte Reaktionszeit zu verfolgen ohne Modifikationen vornehmen zu müssen (5). Durch die Entwicklung neuer Probenköpfe wie den Mikroprobenköpfen oder den Cryo-Probenköpfen konnte die benötigte Probenmenge reduziert werden. Auch die Entwicklungen schneller multidimensionaler NMR-Experimente wie dem SOFAST-HMQC, ULTRAFAST 2D NMR oder ASAP-HSQC bieten neue Möglichkeiten für den Einsatz der NMR-Spektroskopie (6-8).

Die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung (Formel 2) ist nötig um die Kinetik einer Reaktion aus einem einzigen Reaktionsansatz zu bestimmen.

$$K_M \ln\left(\frac{[S]}{[S]_0}\right) + [S]_0 - [S] = v_{\max} t$$

Formel 2: Integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung. $[S]$ ist die Substratkonzentration und $[S]_0$ die Substratkonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$, K_M die Michaelis-Menten-Konstante und v_{\max} die Maximale Reaktionsgeschwindigkeit.

Die integrierte Form konnte seit ihrer Veröffentlichung durch MICHAELIS und MENTEN lange Zeit nicht für die Substratkonzentration $[S]$ gelöst werden. Erst 1997 schlugen SCHNELL und MEDOZA eine Lösung vor, die die Lambert W-Funktion nutzt (9). Die Lambert W- oder Omegafunktion ist die Umkehrfunktion von $x = xe^x$ (10).

$$W(x) + \ln\{W(x)\} = \ln(x)$$

Formel 3: Lambert-W-Funktion

Die Lambert W-Funktion ist in zwei Funktionsarme aufgeteilt: den W_0 -Arm, beginnend bei $y > -1$ und den Funktionsarm W_{-1} , welcher bei $y < -1$ beginnt.

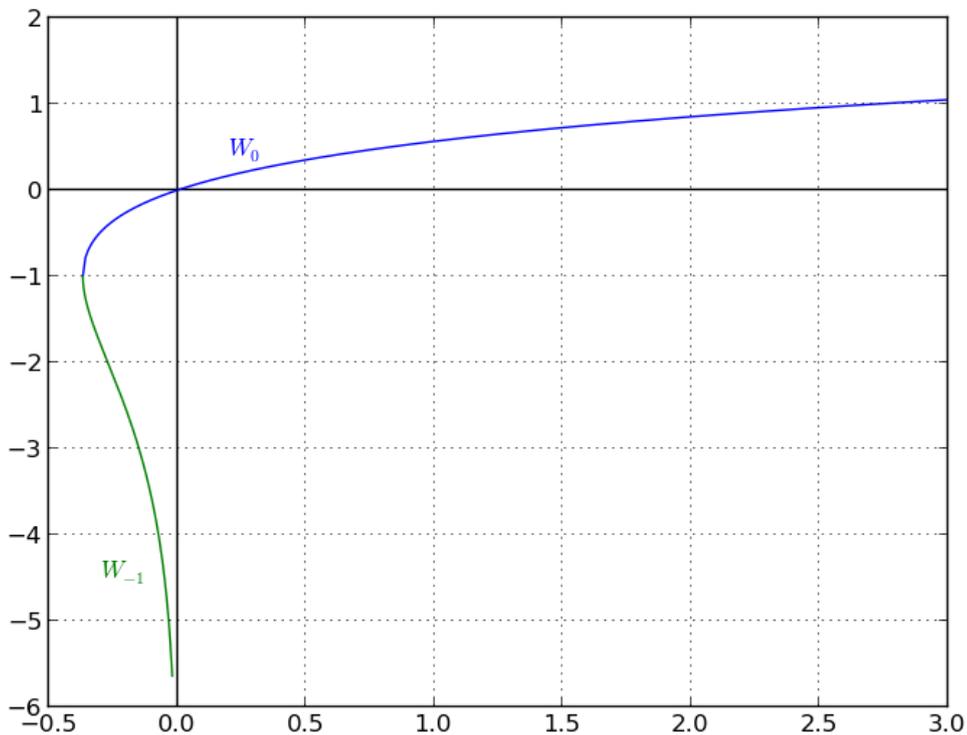


Abbildung 1: Lambert W-Funktion. In blau ist der Funktionsast W_0 und in grün ist der Funktionsast W_{-1} dargestellt (11).

Mit Hilfe des W_0 -Funktionsastes der Lambert W-Funktion kann die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung umformuliert werden, dass sie nach der Substratkonzentration in Abhängigkeit der Zeit aufgelöst werden kann:

$$[S] = K'_M W \left\{ \frac{[S]_0}{K'_M} \exp \left(\frac{[S]_0 - v'_{\max} t}{K'_M} \right) \right\}$$

Formel 4: Integrierte Michaelis-Menten Gleichung mit Lambert W-Funktion. Aufgelöst nach der Abhängigkeit der Substratkonzentration von der Reaktionszeit.

Im Gegensatz zum klassischen Verfahren werden mit dieser Gleichung die apparente Michaelis-Menten-Konstante K'_M und die apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit v'_{\max} bestimmt. Diese Werte enthalten eine eventuell auftretende Produktinhibition, die vor allem im späteren Verlauf der Reaktion einen großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben kann. Die Konzentration-Zeit-Kurven können mit Hilfe von mathematischer Software wie zum Beispiel MATLAB[®] ausgewertet werden. Dabei wird eine nichtlineare Kurvenanpassung verwendet (10,12-16).

4 Methoden

4.1 Peptidsynthese

Peptide setzen sich aus mehreren Aminosäuren zusammen und können chemisch, biochemisch oder enzymatisch dargestellt werden (17). Neben der Amino- und Carboxyfunktion, über die die peptidische Bindung geknüpft wird, verfügen Aminosäuren auch häufig weitere funktionelle Gruppen in der Seitenkette und es ist daher nötig für die Synthese eine geeignete Schutzgruppenstrategie zu wählen. Ferner ist es nötig, die Carboxyfunktion z.B. als Aktivester zu aktivieren, so dass die Reaktion unter milden Bedingungen stattfinden kann.

Die von R.B. MERRIFIELD entwickelte Festphasensynthese (18) bietet gegenüber der Synthese in Lösung den Vorteil, dass überschüssige Reagenzien durch Filtrieren ohne Ausbeuteverlust entfernt werden können. Die Peptide werden gegensätzlich zur Biosynthese vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Als feste Phase wird gewöhnlich ein funktionalisiertes Polystyrolharz eingesetzt, an dem, über einen Linker verknüpft, das Peptid aufgebaut wird.

Die Peptidsynthese an fester Phase ist in Abbildung 2 beschrieben. Nach der Entschützung des Harzes mit DMF und Piperidin wird die erste Aminosäure an das Harz gekuppelt (Schritt 1). Die Aktivierung der Carboxylgruppe der Aminosäure erfolgt mit *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium Tetrafluoroborat (TBTU) und *Diisopropylamin* (DIPEA). Nach der Kupplung wird die Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppe (Fmoc) der um eine Aminosäure verlängerten Kette mit Piperidin abgespalten (Schritt 2). Die Kette kann nach dem gleichen Prinzip wie in Schritt 1 durch eine weitere Aminosäure verlängert werden (Schritt 3). Es ist möglich und vor allem bei schwierig zu kuppelnden Aminosäuren sinnvoll, nach der Kupplung einen Cappingsschritt einzubauen (Schritt 4). Dazu werden alle freien Aminfunktionen mit Essigsäureanhydrid umgesetzt und so für weitere Kupplungsschritte blockiert. Dies verhindert die Bildung von Peptidketten mit zu kurzen und falschen Sequenzen, was die Reinigung des Endprodukts erleichtert. Die Schritte 2-4 werden nun solange wiederholt, bis die gewünschte Sequenz vollständig erstellt ist. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin, kann das Peptid mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA), *Triisopropylsilan* (TIPS) und Wasser vom Harz abgespalten werden. Dabei entsteht das Peptid mit Amidfunktion am C-Terminus. Unter diesen Bedingungen werden auch alle Schutzgruppen der Seitenketten entfernt.

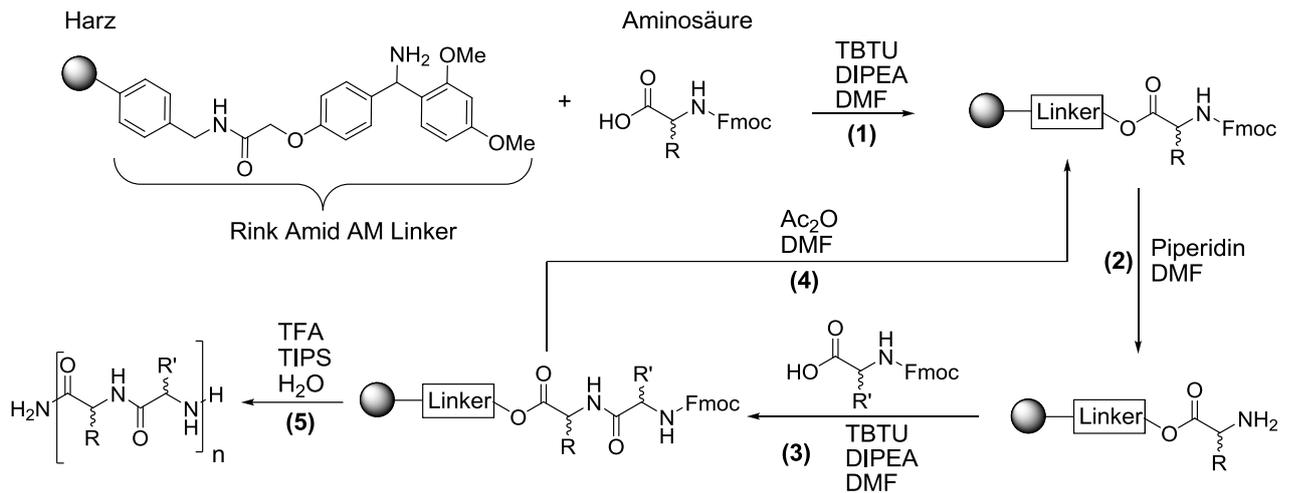


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie. Reaktionsschritt (1) stellt die Aktivierung der Aminosäure und ihre Kupplung an das Harz, Schritt (2) die Entschützung der gekoppelten Aminosäure, Schritt (3) die Aktivierung und Kupplung der nächsten Aminosäure und Schritt (4) die Abbruchreaktion für nicht verlängerte Ketten dar. Schritt (5) beschreibt die Abspaltung vom Harz bei gleichzeitiger Entschützung der Seitenketten.

Das Abspaltprodukt der Fmoc-Schutzgruppe (Methylenfluoren) ist UV-aktiv und so kann bei jedem Entschützungsschritt die Rohausbeute der vorhergegangenen Kupplung durch Messung der UV-Absorption bestimmt werden.

4.2 Saturation Transfer Difference NMR-Spektroskopie

Die *saturation transfer difference* (STD) NMR-Spektroskopie ist eine Methode zur Untersuchung der Bindungseigenschaften eines niedermolekularen Ligandmoleküls an ein Protein und wurde erstmals 1999 von MAYER und MEYER verwendet (19,20). Außerdem ist es möglich, mit Hilfe des STD-NMR-Experiments Informationen über die Bindungsstärke (Dissoziationskonstante, K_D) und das Bindungsepitop des Liganden zu erhalten (21). Die STD-NMR-Spektroskopie beruht auf dem Sättigungstransfer vom Protein auf den Liganden. Die Sättigung wird am freien Liganden nach der Dissoziation gemessen. Für die Methode ist keine Isotopenmarkierung des Proteins nötig und nur geringe Mengen an Protein reichen aus um Ergebnisse zu erhalten. Auch sind meist ¹H-NMR Pulssequenzen ausreichend, um die Bindungseigenschaften charakterisieren zu können (20).

Proteine besitzen aufgrund ihrer kurzen T_2 -Relaxationszeiten eine hohe Linienbreite. Es ist deshalb möglich mit einer Kaskade von selektiven Gausspuls, in der Regel ein bis vier Sekunden lang und bei einer chemischen Verschiebung von 0 bis -1.5 ppm, das Protein zu

sättigen. Die Sättigung wird durch die Spindiffusion, einem indirekten Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen über einen dritten, auf das gesamte Protein übertragen. Dieser Effekt tritt bei Molekülen ab ca. 10 kDa auf, weil bei diesen die Kreuzrelaxationsrate groß gegenüber der T_1 -Relaxationszeit ist. Die Spindiffusion wird mit steigendem Molekulargewicht immer größer, deshalb gibt es keine Obergrenze bezüglich der Proteingröße (20).

Bei einem STD-Experiment werden zwei Spektren aufgenommen: Das *off resonance*-Spektrum und das *on resonance*-Spektrum. Die Ligandsignale im *on resonance*-Spektrum sind durch Übertragung der Sättigung vom Protein abgeschwächt. Der Sättigungspuls wird auch während des *off resonance*-Experiments eingestrahlt, allerdings hier außerhalb des Messbereichs und es wird keine Sättigung des Proteins erreicht. Die Einstrahlung des *off resonance*-Sättigungspulses ist wichtig, um Differenzartefakte durch Temperaturschwankungen zu vermeiden. Durch Subtraktion des *on resonance*- vom *off resonance*-Spektrum erhält man das STD-Spektrum (siehe Abbildung 3).

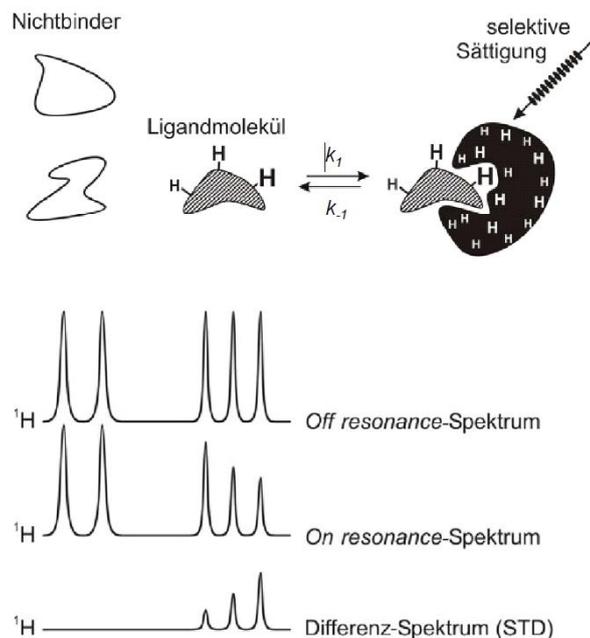
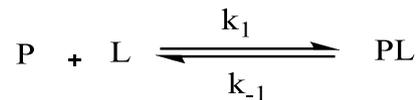


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips des STD-Experiments (22). Der obere Teil der Abbildung zeigt schematisch die Übertragung der Sättigung vom Protein auf den Liganden. Im unteren Teil ist das *off resonance*-Spektrum ohne Sättigungspuls und das *on resonance*-Spektrum mit Sättigungspuls. Durch Subtraktion des *on resonance*- vom *off resonance*-Spektrum entsteht das Differenz-Spektrum. Die Stärke der Intensitätsabnahme im *on resonance*-Spektrum hängt unter anderem von der Nähe des Protons zur Oberfläche des Proteins ab. Über die verschiedenen starken Intensitätsabnahmen lässt sich das *epitope mapping* erstellen.

Die Intensität der STD-Signale hängt vom Abstand der Ligandprotonen zu den entsprechenden Proteinprotonen ab. Dabei spielt die Kreuzrelaxationsrate, die mit $1/r^6$ abnimmt, eine entscheidende Rolle.

Durch die Intensität der STD-Signale lässt sich ein *group epitope mapping* erstellen (23). Allerdings spielt auch die Bindungskinetik eine Rolle (20). Für die Bindung eines Liganden an ein Protein lässt sich folgende Reaktionsgleichung aufstellen:



Für die Reaktion lässt sich ein Dissoziationsgleichgewicht mit der Dissoziationskonstante K_D aufstellen (Formel 5).

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Formel 5: Dissoziationsgleichgewicht der Protein-Ligand-Wechselwirkung; K_D = Dissoziationskonstante; $[P]$ = Konzentration des Proteins; $[L]$ = Konzentration des Liganden; $[PL]$ = Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes; k_1 = Assoziationsrate; k_{-1} = Dissoziationsrate.

Ist die Dissoziationsrate deutlich kleiner als die Sättigungszeit, ist auch die Zahl der Ligandmoleküle, die die Bindungstasche erreichen, klein. Ist die Dissoziationsrate deutlich größer, so findet während der Zeit, die der Ligand in der Bindungstasche verbringt, kein ausreichender Sättigungstransfer statt.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D müssen Titrationskurven aufgezeichnet werden. Dabei wird für verschiedene Ligandkonzentrationen der STD-Effekt bestimmt und der STD-Amplifikationsfaktor berechnet (Formel 6). Der STD-Amplifikationsfaktor berücksichtigt sowohl die absoluten STD-Intensitäten als auch den Ligandüberschuss und dient so der Quantifizierung des Durchsatzes an Ligandmolekülen.

$$STD_{Ampl.} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \times \frac{[L]_0}{[P]_0}$$

Formel 6: Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors $STD_{Ampl.}$; I_0 = Signalintensität im *off resonance*-Spektrum; I_{sat} = Signalintensität im *on resonance*-Spektrum; $[L]_0$ = Gesamtkonzentration Ligand; $[P]_0$ = Proteinkonzentration.

Bei einer spezifischen Ligandbindung erhält man bei der Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors gegen die Ligandkonzentration eine Sättigungskurve, die sich mit dem

one-site binding Modell auswerten lässt. Die Dissoziationskonstante ergibt sich dabei nach Formel 7 (21).

$$STD_{Ampl.} = \frac{STD_{Ampl.(\max)} [L]}{K_D + [L]}$$

Formel 7: Auswertung einer Titrationsreihe nach dem *one-site binding Modell*. $STD_{Ampl.(\max)}$ = Sättigungswert der Bindungskurve; K_D = Dissoziationskonstante; $[L]$ = Ligandkonzentration.

4.3 Quantitative NMR

Die Integration von Signalen in ^1H -NMR-Spektren wird regelmäßig angewandt, um die relative Anzahl an Protonen zu bestimmen. Routinemäßig gemessene Spektren weisen oft einen Fehler von 10-20% auf. Dieser Fehler ist für die genaue Quantifizierung viel zu groß, kann aber durch das Einhalten bestimmter Parameter während der Aufnahme und Prozessierung eines Spektrums minimiert werden. Auch die Quantifizierung aus Heteronuklei-Spektren ist möglich, bedarf jedoch häufig sehr langer Messzeiten. Es gibt für die NMR-Spektroskopie kein Äquivalent zur genauen Quantifizierung wie zum Beispiel den Extinktionskoeffizienten bei der UV-Spektroskopie. Durch den Zusatz eines Standards oder Messung einer Eichreihe mit bekannten Konzentrationen ist es aber möglich, eine definierte Aussage zur Menge einer Substanz zu treffen (24).

Neben dem Signal-Rausch-Verhältnis gibt es drei weitere Faktoren, die zu beachten sind, wenn man aus einem NMR-Spektrum quantifizieren will: Sättigungseffekte, die Linienart und NOE-Verstärkungen (*Nuclear Overhauser Effekt*). Um Sättigungseffekte auszuschließen ist es wichtig, dass zwischen den Pulsen mindestens eine Zeitspanne von $5 \cdot T_1$ vergeht. Die Relaxationszeit T_1 bezieht sich dabei auf die Relaxationszeit des Kerns der zu bestimmenden Substanz, der am langsamsten relaxiert. Dadurch kann mit einem 90° -Puls immer das größtmögliche Signal für alle Kerne gemessen werden. Für Protonen ist die Relaxationszeit T_1 meist recht kurz und liegt im Bereich von wenigen Sekunden, bei Heterokernen kann diese Zeit jedoch mehrere Minuten betragen. Es gibt jedoch die Möglichkeit die Relaxationszeit durch Zugabe von Relaxationsreagenzien zu verkürzen.

Für die Linienart ist es wichtig, dass der Bereich der Resonanzlinienbreite mindestens von vier Datenpunkten abgedeckt ist. Je mehr Datenpunkte das Signal beschreiben, umso genauer kann quantifiziert werden. Die Anzahl der Datenpunkte pro Signal kann dadurch erhöht werden, dass

der Messbereich verkleinert wird. Dabei sollte jedoch darauf geachtet werden, dass der Receiverfilter keinen Einfluss auf die Intensität der äußersten Signale hat.

NOE-Verstärkungseffekte treten nur bei Breitband-Proton-entkoppelten Heterokernspektren auf. Sie entstehen durch NOEs auf Grund von Protonensättigung. Der NOE kann durch *inverse-gated decoupling schemes* unterdrückt werden.

Bei der Prozessierung ist es wichtig darauf zu achten, dass alle Signale im *absorption-mode* vorliegen. Eine schlechte Phasenkorrektur führt zu kleineren Integralen, da *desorption-mode* Signale auch einen negativen Integralanteil aufweisen. Selbst kleine Abweichungen von einem reinen *absorption-mode* Signal können schon große Auswirkungen haben. Vor allem bei Heterokernspektren ist es sinnvoll, eine exponentielle Gewichtungsfunktion anzuwenden, die das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, aber auch zu einer Linienverbreiterung führt. Durch die Anwendung eines *zero-fillings* ist möglich, die Signalqualität weiter zu verbessern. Hier muss jedoch darauf geachtet werden, dass das *zero-fillings* nicht als Substitution für die Digitalisierung des Signals verwendet werden kann.

Es ist nötig über die 20fache Linienbreite auf jeder Seite des Signalmittelpunkts zu integrieren, um 99% der Fläche eines LORENTZförmigen Signals zu integrieren. Dies ist häufig jedoch nicht praktikabel und es wird mit kleineren Integrationsbereichen gearbeitet. Sofern immer über den gleichen Bereich integriert wird, ist über eine Kalibrierung mit einer bekannten Konzentration ebenfalls eine präzise Quantifizierung möglich.

4.4 Thermophorese im Mikromaßstab

Ein Temperaturgradient in einer wässrigen Lösung führt nicht nur zu einem Temperaturfluss, sondern auch zu einem Fluss von gelösten Molekülen. Die Kopplung von Temperatur- und Massenfluss ist als Ludwig-Soret-Effekt oder Thermophorese bekannt (25). Thermophorese in Lösungen wurde das erste Mal 1879 systematisch untersucht und es wird heute für gewöhnlich angenommen, dass Thermophorese ein lokaler Zustand eines Ungleichgewichts ist, der Flüssigkeitsdynamiken, Kraftfelder oder Partikel-Festkörper-Potentiale zur Beschreibung benötigt (26-30). Andere Herangehensweisen nehmen an, dass die Moleküle in einem lokalen thermodynamischen Gleichgewicht vorliegen und wenden Gleichgewichts-Thermodynamik an, um Thermophorese in Flüssigkeiten zu beschreiben (31,32). Für die meisten theoretischen Beschreibungen ist die Oberfläche der Lösungsmittelmoleküle sowie deren Ladung von großer Bedeutung. Die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten aus der Einstein-Gleichung reicht zur Beschreibung der Thermophorese jedoch nicht aus, weil der praktisch gemessene Effekt gewöhnlich zehnmal größer ist.

Die Bewegung von Molekülen in einem Temperaturgradienten wird im Allgemeinen phänomenologisch mit einer linearen Drift-Antwort beschrieben (33). Die Molekülgeschwindigkeit $v = -D_{Ti} \text{ grad } T$ ist linear abhängig vom Temperaturgradienten ($\text{grad } T$) über den Proportionalitätsfaktor D_{Ti} , welcher als thermaler Diffusionskoeffizient oder thermophoresische Mobilität bezeichnet wird. Im Gleichgewicht wird diese Bewegung durch die Massendiffusion ausgeglichen. Für niedrige Konzentration lässt sich dieses Gleichgewicht mit Formel 8 beschreiben (34):

$$j_i = -c_i D_{Ti} \text{ grad } T - D_i \text{ grad } c_i$$

Formel 8: Konzentration im Gleichgewicht mit D_i = Diffusionskoeffizient, D_{Ti} = thermaler Diffusionskoeffizient, c_i = Konzentration, $\text{grad } T$ = Temperaturgradient, $\text{grad } c_i$ = Konzentrationsgradient.

Integriert man Formel 8 mit temperaturunabhängigen D_{Ti} und D_i erhält man die Gleichgewichtskonzentration Formel 9 mit dem Soret-Koeffizienten S_{Ti} , der sich aus dem Verhältnis D_{Ti}/D_i ergibt.

$$c_{Ti} = c_i \exp(-S_{Ti} dT)$$

Formel 9: Integration von Formel 8 mit temperaturunabhängigen Diffusionskoeffizienten. S_{Ti} ist der Soret-Koeffizient der sich aus dem Verhältnis $S_{Ti} = D_{Ti}/D_i$ ergibt.

Die Konzentration c_{Ti} ist für gewöhnlich niedriger als die Initialkonzentration c_i und der thermale Diffusionskoeffizient D_{Ti} und der Soret-Koeffizient S_{Ti} somit positiv. Für Biomoleküle wird allerdings auch eine Erhöhung der Konzentration im Vergleich zur Initialkonzentration festgestellt. Allgemein ist der Soret-Koeffizient abhängig von der Größe des Moleküls, seiner Ladung und seiner Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel (35). Mindestens einer dieser Parameter wird durch die Bindung mit einem Liganden verändert und es können so eine Reihe von molekularen Wechselwirkungen untersucht werden (34).

Der Aufbau eines *Microscale Thermophoresis Experiments* (MST) ist in Abbildung 4A schematisch dargestellt (34). Dabei wird ein Infrarotlaser mit einem Fluoreszenz Detektions-/Anregungskreislauf über einen Infrarot-dichromatischen Spiegel gekoppelt. Der IR-Laser wird über die gleichen optischen Bauteile auf die Probe fokussiert wie auch der Fluoreszenzdetektor. Der IR-Laser ist dabei für die lokale Erwärmung der Probe verantwortlich ohne die ein erfolgreiches MST Experiment nicht durchgeführt werden kann. Mit einem IR-Laser lassen sich dabei lokale Erwärmungen mit einer Reproduzierbarkeit im mK-Bereich erreichen und auf ein Volumen mit Kantenlängen von wenigen hundert Mikrometern begrenzen. Die lokale Begrenzung der Erwärmung ist essentiell für ein schnelles MST Experiment. Die Molekülbewegung ist durch die Diffusion limitiert und durch die Eingrenzung der Temperaturverteilung auf einen μm Bereich können die Änderungen der thermophoretischen Eigenschaften innerhalb von 30 s quantifiziert werden.

Für gewöhnlich wird die IR-Laser Stärke so gewählt, dass sich die Temperaturverteilung auf einen Bereich von 200 μm beschränkt. Innerhalb einer Sekunde wird die Energie des IR-Lasers von der Probe absorbiert und die Temperaturverteilung erreicht ein Gleichgewicht mit einem Anstieg von gewöhnlich 2-6 K. Nach diesem Temperaturanstieg (*MST T-Jump*) setzt die Thermophorese ein und es entsteht ein Konzentrationsgradient innerhalb der Probe.

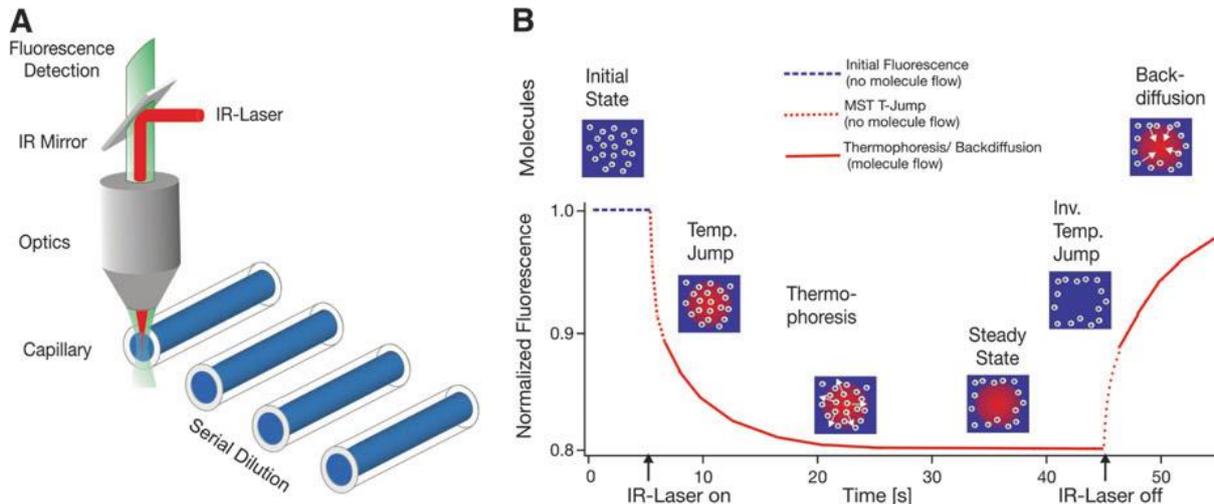


Abbildung 4: A Aufbau des Microscale Thermophoresis (MST) Experiments. Ein IR-Laser und ein Fluoreszenzdetektionssystem werden gekoppelt und über die gleichen optischen Bauteile auf die in einer Kapillare befindliche Probe geleitet. B Verlauf des normalisierten Fluoreszenzsignals während eines MST Experiments. Das Signal kann in die folgenden Abschnitte eingeteilt werden: „MST Temp Jump“, die Änderung der Fluoreszenz durch das Anschalten des IR-Lasers und die damit verbundene Temperaturänderung; „Thermophoresis“, Veränderung des Fluoreszenzsignals aufgrund des Molekülflusses, der durch den Temperaturgradienten hervorgerufen wird; „inverse T-Jump“, die Änderung des Fluoreszenzsignals durch rapides Abkühlen der Lösung nach Ausschalten des IR-Lasers; und „Backdiffusion“, der Normalisierung des Fluoreszenzsignals auf das Ausgangsniveau durch die Rückdiffusion der Moleküle (34).

Das Fluoreszenzsignal, welches während einer MST Messung erhalten wird, kann in mehrere unterschiedliche Abschnitte, abhängig von der Zeitskala und der Wärmezufuhr durch den IR-Laser, aufgeteilt werden (siehe Abbildung 4B). Diese Abschnitte sind folgende: „Initial State“, die Fluoreszenz zu Beginn des Experiments ohne Temperaturzufuhr; „MST Temp Jump“, die Änderung der Fluoreszenz durch das Anschalten des IR-Lasers und die damit verbundene Temperaturänderung; „Thermophoresis“, Veränderung des Fluoreszenzsignals aufgrund des Molekülflusses, der durch den Temperaturgradienten hervorgerufen wird; „inverse T-Jump“, die Änderung des Fluoreszenzsignals durch rapides Abkühlen der Lösung nach Ausschalten des IR-Lasers; und „Backdiffusion“, der Normalisierung des Fluoreszenzsignals auf das Ausgangsniveau durch die Rückdiffusion der Moleküle.

Es kann im Gleichgewicht das Konzentrationsverhältnis c_{hot}/c_{cold} nach Formel 9 als $c_{hot}/c_{cold} = \exp(-S_T \Delta T) \approx 1 - S_T \Delta T$ angenommen werden. Diese Linearisierung ist aufgrund der geringen Temperaturdifferenz (2-6 K) gegenüber der absoluten Temperatur (etwa 300 K) und der geringen Konzentrationsdifferenz gegenüber der Ausgangskonzentration möglich. Das MST Experiment nutzt das Fluoreszenzsignal, um Änderungen in der Konzentration von Molekülen zu detektieren und quantifizieren. Dazu wird die Fluoreszenz vor dem Anschalten

($F_{initial}$) und eine definierte Zeit nach Dem Einschalten des IR-Lasers (F_{hot}) gemessen. Die normalisierte Fluoreszenz $F_{norm} = F_{hot}/F_{initial}$ spiegelt allerdings nur zum Teil das Konzentrationsverhältnis wieder. Der MST T-Jump $\delta F/\delta T$ ist ebenfalls Teil des Signals. Dieser Teil des Signals wird durch die Veränderung der Fluoreszenzausbeute des verwendeten Fluoreszenzfärbemittels durch den Temperaturunterschied verursacht.

Für den T-Jump gilt für $F_{norm} = 1 + (\delta F/\delta T - S_T) \Delta T$. (36) Ein Bindungsereignis kann in einigen Fällen sowohl im schnellen T-Jump (<1 s) als auch in der langsameren Thermophorese (>1 s) beobachtet werden. Die Wahl des Zeitpunkts entscheidet, welcher der beiden Prozesse zur Auswertung herangezogen wird. Es hat sich dabei herausgestellt, dass ein Bindungsprozess, der den Zustand eines markierten Moleküls verändert, sich eher auf den T-Jump auswirkt und Veränderungen der Größe, der Ladung oder des Hydrationszustands sich eher im Signal für die Thermophoresephase bemerkbar machen. Häufig lassen sich die Auswertungen beider Bereiche kombinieren und man erhält ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis.

Ein typisches MST Experiment zur Quantifizierung einer Interaktion ist als Titrationsreihe aufgebaut. Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Moleküls wird konstant gehalten, während die Konzentration des unmarkierten Binders variiert wird. Es wird für gewöhnlich mit einer zehnfach höheren Konzentration als der erwarteten Dissoziationskonstante gestartet und bis zu einem substöchiometrischen Verhältnis bezogen auf den markierten Binder verdünnt. Das MST Signal detektiert die Bindung als Veränderung der normalisierten Fluoreszenz. Aus Formel 10 kann die Bindungsstärke quantifiziert werden.

$$F_{norm} = (1-x)F_{norm}(unbound) + xF_{norm}(bound)$$

Formel 10: Zusammensetzung des gemessenen, normalisierten Fluoreszenzsignals. Mit F_{norm} = normalisierte Fluoreszenz, $F_{norm}(unbound)$ = normalisierte Fluoreszenz von markierten Molekülen im ungebundenen Zustand, $F_{norm}(bound)$ = normalisierte Fluoreszenz von markierten Molekülen im gebundenen Zustand.

Dabei ist x der Teil der fluoreszenzmarkierten Moleküle, der im gebunden Zustand vorliegt und aus dem Verhältnis der gebundenen und ungebunden Moleküle lässt sich die Dissoziationskonstante berechnen (36).

5 NMR-Spektroskopische Untersuchungen der Methyltransferase Set8

5.1 Histone

Zelluläre DNA weist eine beachtliche Länge auf und ist deshalb zwischen zwei Replikationsphasen mit Hilfe von Proteinen zu einem kompakten Komplex gebunden (1). Dieser Komplex wird als Chromatin bezeichnet, mehrere dieser Komplexe bilden dann die Chromosomen. Der Proteinanteil des Chromatins macht etwa die Hälfte der Masse aus und besteht hauptsächlich aus Histonen. Die Histone werden in fünf Hauptklassen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) eingeteilt und besitzen alle einen hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren (Arginin und Lysin), die eine starke Bindung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA bilden können.

Histone unterscheiden sich zwischen verschiedenen Spezies nur minimal in ihrer Aminosäuresequenz und wurden auch evolutionär sehr gut erhalten. Dies lässt darauf schließen, dass ihre Struktur bereits für ihre wichtige Funktion optimiert ist und Veränderungen in der Sequenz das Ausüben dieser Funktion unmöglich machen. Lediglich das Histon 1 ist in seiner Sequenz etwas variabler, es erfüllt aber auch etwas andere Aufgaben als die anderen Histone.

Einzelne Chromatinpartikel, sogenannte Nucleosome, bestehen aus dem Oktamer $(H2A)_2(H2B)_2(H3)_2(H4)_2$ und ca. 200 Bindungsparen angelagerter DNA (37). Die Röntgenkristallstruktur (Abbildung 5) zeigt eine nahezu zweizählige Symmetrie für das Oktamer. Das Histon 1 ist an der Verknüpfung der einzelnen Chromatinpartikel beteiligt.

Alle Histone unterliegen posttranskriptionalen Modifikationen. Dies können z.B. Methylierungen, Acetylierungen oder Phosphorylierungen sein und unterscheiden sich jedoch im Gegensatz zu den Sequenzen je nach Spezies. Diese Modifikationen finden an spezifischen Arginin-, Lysin-, Histidin-, Serin- und Threoninresten statt und verringern so die positive Ladung der Histone. Durch die veränderte Ladung wird die Bindung zwischen Histon und DNA abgeschwächt und die DNA wird so wieder zugänglich. Die Modifikationen unterscheiden sich je nachdem in welcher Phase sich die Zelle befindet (38). Die spezifische Methylierung von Lysinen in den Histonen H1, H3 und H4 ist eine wichtige Modifikation zur Kontrolle der Genexpression (39,40). Die mono-Methylierung von Lys 20 des Histons H4 durch die

Methyltransferase SET8 ist besonders häufig in nicht-transkriptionalen Bereichen anzutreffen (41).

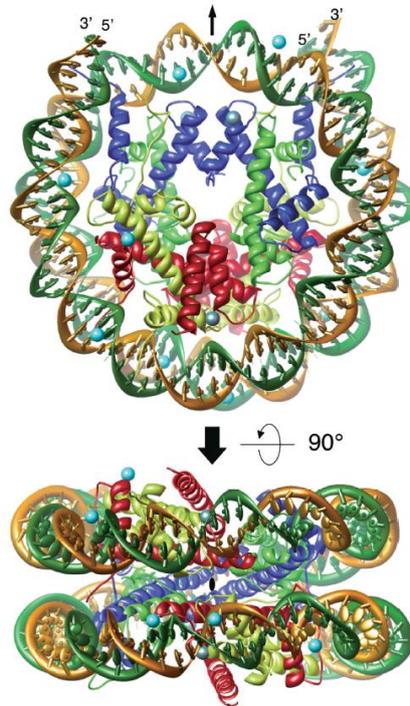


Abbildung 5: Schleifenmodell des Histonoktamers mit DNA-Strang. H3 ist in blau, H4 in grün, H2B in gelb und H2B in rot dargestellt. In braun und grün sind die I- und J-Ketten der DNA gezeigt, Mangationen als cyane und Chloridionen als graue Bälle (42).

5.2 Methyltransferase SET8

Die Methyltransferase SET8 (EC 2.1.1.43, auch bekannt als PR-SET7) ist verantwortlich für die mono-Methylierung der ϵ -Aminogruppe des Lys 20 des Histons H4 und dadurch für die transkriptionale Unterdrückung in Metazoen (43). Für die Methylierung benötigt SET8 S-Adenosyl-L-methionin (SAM) als Cosubstrat (44). Sowohl der Grad der Lys 20 Methylierung als auch die Expression von SET8 erreichen ihren höchsten Wert während der Mitose-Phase des Zellzyklus. Das Methylierungsmuster des Lys 20 kann über die Zellteilung hinaus beobachtet werden und es wird angenommen, dass die Methylierung durch SET8 einen epigenetischen Einfluss auf die Unterdrückung der Transkription hat (43).

Knock-Out-Studien mit inaktiven SET8 Mutanten an *Drosophila* zeigten eine erhöhte Sterblichkeit in der Larven- und Verpuppungsphase (45). Es konnte eine deutliche Verringerung der mono-, di- und tri-Methylierung des H4 Lys 20 festgestellt werden. Außerdem wurden Anomalien während der Mitosephase festgestellt. Es wurden geringere Zellgrößen sowie Zellen mit mehreren Zellkernen beobachtet, was auf eine endoreplikative Zellteilung hindeutet (46). Ähnliche Ergebnisse ergab die Unterdrückung der Expression von SET8 in HeLa-Zellen (47). Aus diesen Studien lässt sich ableiten, dass SET8 für den Erhalt von H4 Lys 20 Methylierungen notwendig ist und so eine wichtige Rolle bei der mitotischen Regulation in Metazoen spielt.

Couture *et al.* konnten die Kristallstruktur von SET8 bestimmen (siehe Abbildung 6 (48)). Die Kristallstruktur konnte jedoch nur durch die Zugabe von S-Adenosyl-L-homocystein (SAH), dem Reaktionsprodukt von SAM, und einem Ausschnitt der N-terminalen Kette des Histons H4 erhalten werden.

Die Untersuchung des H4-Bindungsmotivs ergab, dass besonders das Arg 17 eine wichtige Rolle spielt. Das resultierende Bindungsmotiv wurde als R- Ω - ζ -K-X- ϕ postuliert, wobei Ω eine Aminosäure mit aromatischem Rest, ζ eine nichtsaure Aminosäure, K die Methylierungsstelle, X eine beliebige und ϕ eine Aminosäure mit sperrigem, hydrophobem Rest ist. Die Produktspezifität von SET8 wurde mittels MALDI Massenspektrometrie untersucht. SET8 katalysiert demnach nur die mono-Methylierung des H4 Lys 20 (48).

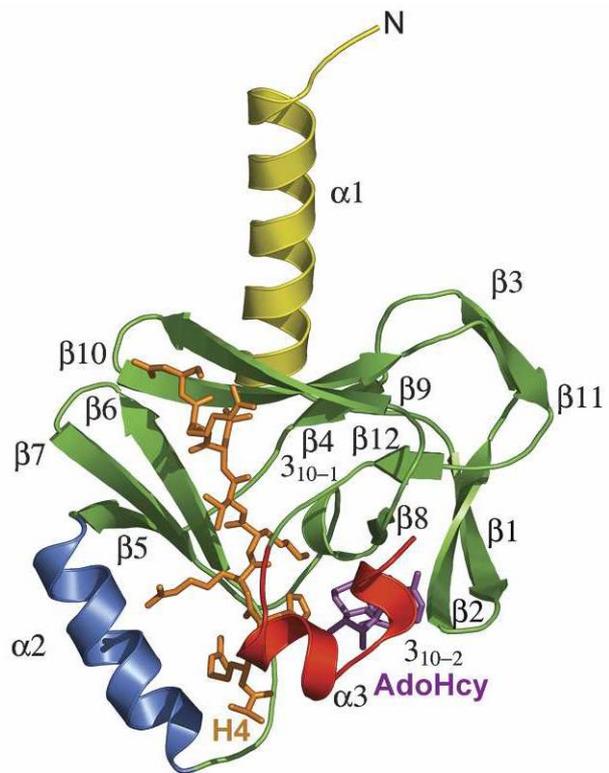


Abbildung 6: Kristallstruktur von SET8 als Schleifenmodell. SET8 ist in die SET- (grün), nSET- (gelb), iSET- (blau) und cSET-Regionen (rot) unterteilt, SAH (magenta) und das H4-Peptid (orange) sind als Strichstrukturen dargestellt (48).

5.3 Aufgabenstellung

Histone stellen einen wichtigen Baustein zur Packung der DNA dar. Durch Modifikationen der Seitenketten verschiedener Aminosäuren wird die Packung der DNA kontrolliert. Die Methylierung des Lysin-20 durch die Methyltransferase Set8 ist einer dieser Mechanismen und spielt für die fehlerfreie Zellteilung eine wichtige Rolle.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, aufbauend auf meiner Diplomarbeit die Bindung weiterer Ausschnitte der Histon 4 Aminosäuresequenz, die das Minimalmotiv R-Ω-ζ-K-X-φ enthalten, zu synthetisieren, auf ihre Bindung zur Methyltransferase zu untersuchen und die Umsetzung mittels NMR-Spektroskopie zu verfolgen.

Die Bindungsstudien sollen mittels STD-NMR-Spektroskopie sowie Microscalethermophorese durchgeführt werden. Die kinetischen Untersuchungen mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie sollen Rückschlüsse auf den Einfluss der Peptidkettenlänge liefern, die Methode der Progresskurvenanalytik validieren und eine Möglichkeit zur Untersuchung von Inhibitoren etablieren.

5.4 Ergebnisse und Diskussion

Die Bindung des Histons 4 an die Methyltransferase Set8 erfolgt über die Aminosäuresequenz R- Ω - ζ -K-X- ϕ wobei Ω eine Aminosäure mit aromatischem Rest, ζ eine nichtsaure Aminosäure, K die Methylierungsstelle, X eine beliebige und ϕ eine Aminosäure mit sperrigem, hydrophobem Rest ist. Dies entspricht dem Sequenzausschnitt ¹⁷RHRKVL²² des Histons 4. Es sollen die Peptide RHRKVL, RHRKVLRD, das um zwei Aminosäuren verlängerte Minimalbindungsmotiv, und AKRHRKVLRD, das Minimalbindungsmotiv mit jeweils 2 vorherigen und nachfolgenden Aminosäuren der Histon 4 Sequenz, synthetisiert und untersucht werden. Des weiteren soll als möglicher Inhibitor das Peptid RHRAVL, welches dem minimalen Bindungsmotiv ohne Methylierungsstelle entspricht, synthetisiert und untersucht werden.

5.4.1 Synthese des Peptids RHRAVL

Das Peptid RHRAVL wurde mittels Festphasensynthese nach MERRIFIELD synthetisiert. Die Bestimmung der Rohausbeute erfolgte durch UV-Absorptionsmessung des bei der letzten Entschützung entstehenden Fluorens. Es wurde eine Stoffmenge von 42.6 μ mol Fluoren erhalten, was auf eine Rohausbeute von 60% schließen lässt. Das synthetisierte Peptid wurde von Harz abgespalten, durch eine Etherextraktion Verunreinigungen entfernt und das Rohprodukt gefriergetrocknet. Es wurden 17.7 mg des Rohprodukts mittels HPLC gereinigt. Die Detektion des Produktes erfolgte sowohl UV-spektroskopisch (Abbildung 7) als auch massenspektrometrisch (Abbildung 8).

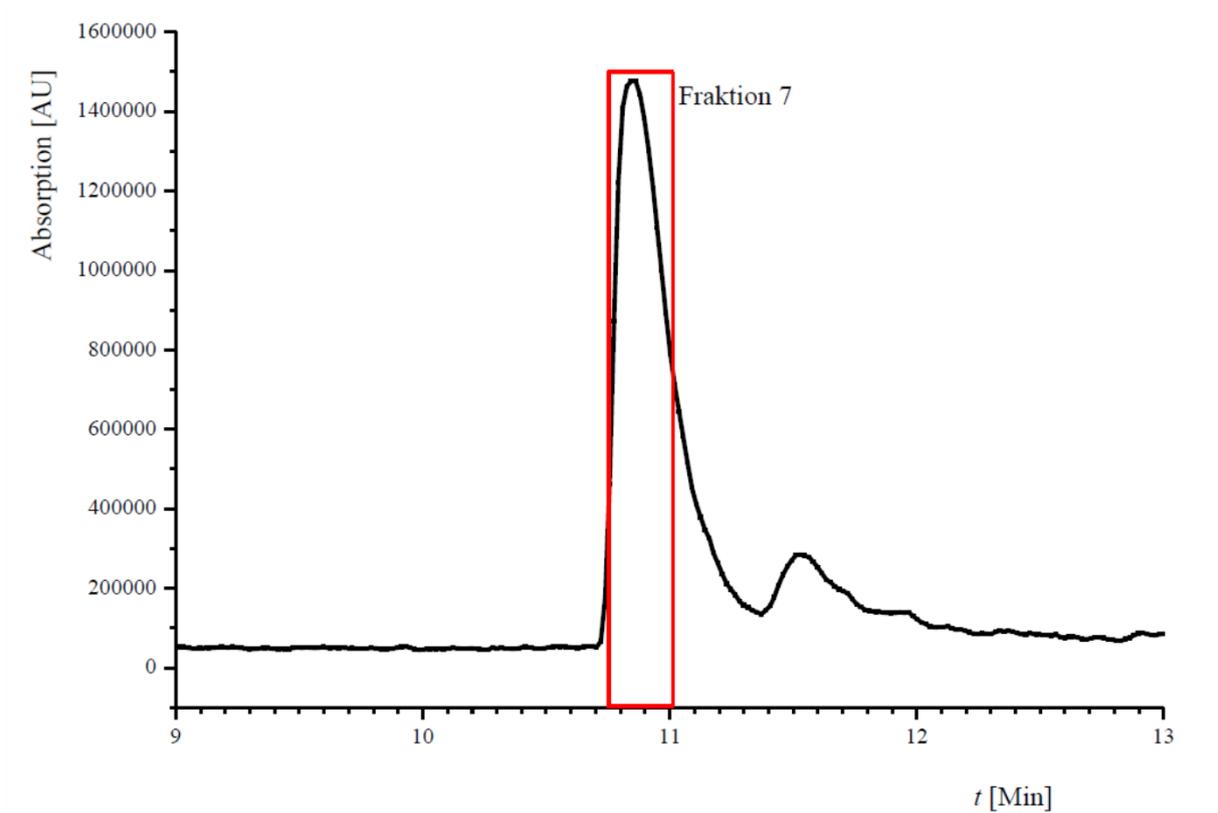


Abbildung 7: UV-Vis-Absorptionsspektrum der HPLC-Reinigung des Peptids RHRAVL.

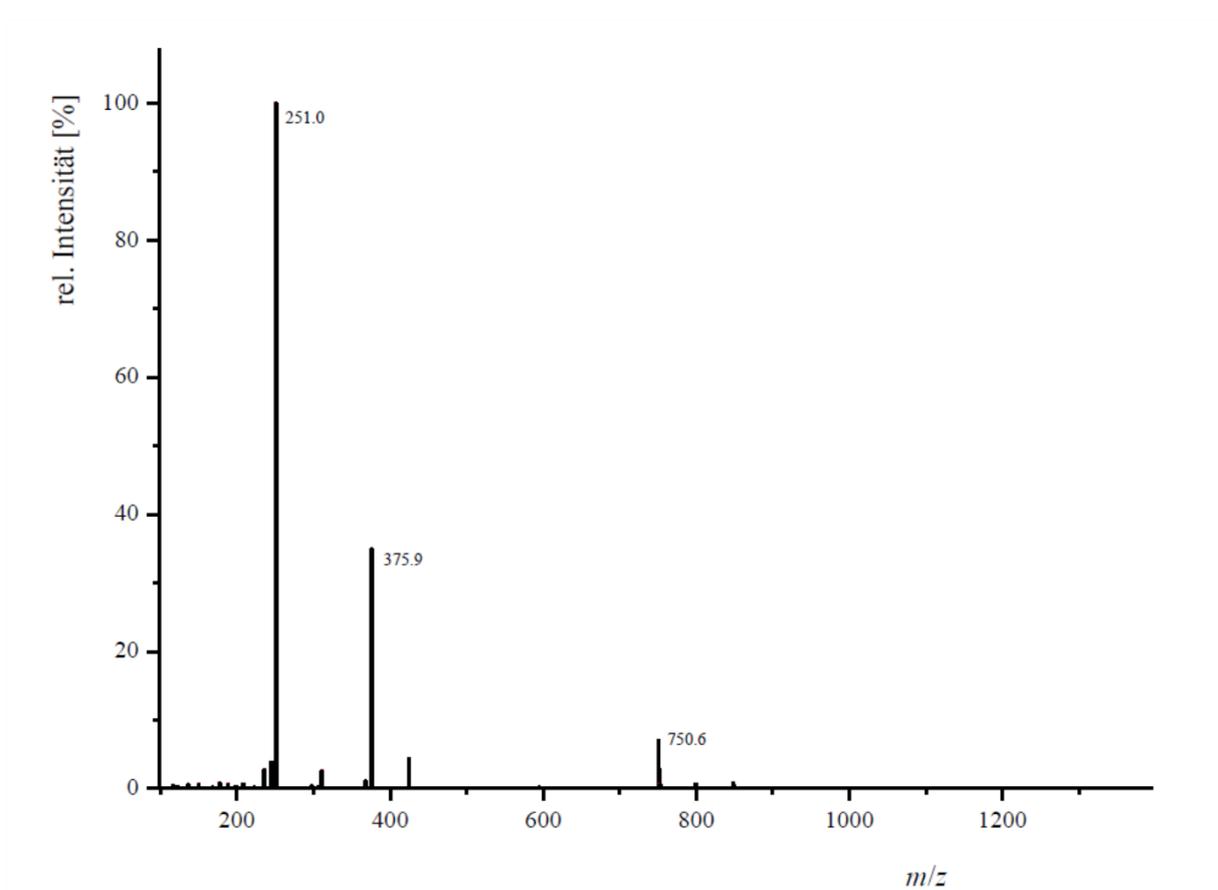


Abbildung 8: Massenspektrum einer typischen Produktfraktion der HPLC-Reinigung des Peptids RHRAVL.

Die Fraktion mit einer Retentionszeit von 10.7-11 Minuten wurde aufgefangen. Die dabei detektierten Masse/Ladungsverhältnisse von 750.6 ($M+H^+$), 357.9 ($M+2H^+$) und 251.0 ($M+3H^+$) entsprechen den erwarteten Masse/Ladungsverhältnissen für das Peptid RHRAVL mit einer Molekülmasse von 749.92 g/mol. Die Fraktion wurde gefriergetrocknet und es wurden 9.8 mg farbloses Pulver erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 33%. Die Identifikation des Peptids erfolgte mittels NMR-Spektroskopie. Das Produkt wurde dazu in H_2O/D_2O 9:1 (pH = 2.1) gelöst. Es wurden ein TOCSY- sowie ein ROESY-Spektrum zur Zuordnung der Signale sowie der Verknüpfung der Aminosäuren verwendet.

Anhand des TOCSY-Spektrums lässt sich die Zusammensetzung des Peptids bestimmen. Es wurden die typischen Spinsysteme für ein Arginin, ein Histidin, ein Alanin, ein Valin und ein Leucin (siehe Abbildung 9) sowie ein N-terminales Arginin identifiziert.

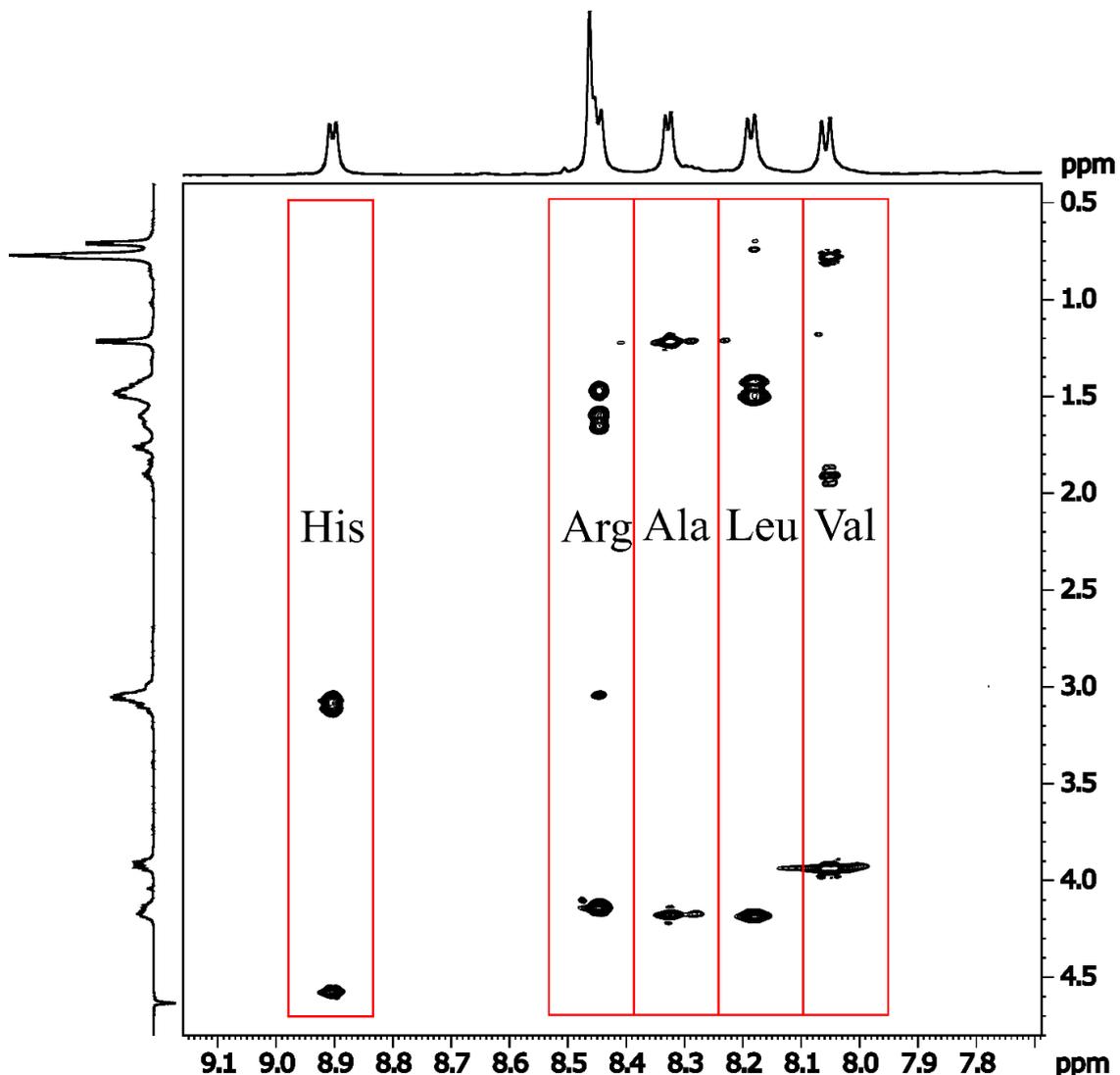


Abbildung 9: Ausschnitt des TOCSY-Spektrums des Peptids RHRAVL. Gezeigt ist der Bereich von 7.7–9.2 ppm. Es sind die erwarteten Spinsysteme eines Valins (8.05 ppm), eines Leucins (8.18 ppm), eines Alanins (8.32 ppm), eines Arginins (8.45 ppm) und eines Histidins (8.90 ppm) zu erkennen.

Die Verknüpfung der Aminosäuren kann durch Kreuzsignale zwischen den Amidsignalen einer Aminosäure und dem H- α -Signal der N-Terminus benachbarten Aminosäure gefolgert werden (siehe Abbildung 10). Die Kette startet mit der Verknüpfung des Leucins und Valins (VL), gefolgt von der Verknüpfung des Valins und Alanins (AV), der Verknüpfung des Alanins und Arginins (RA), der Verknüpfung des Arginins und Histidins (HR) und der Verknüpfung des Histidins mit dem N-terminalen Arginin (RH).

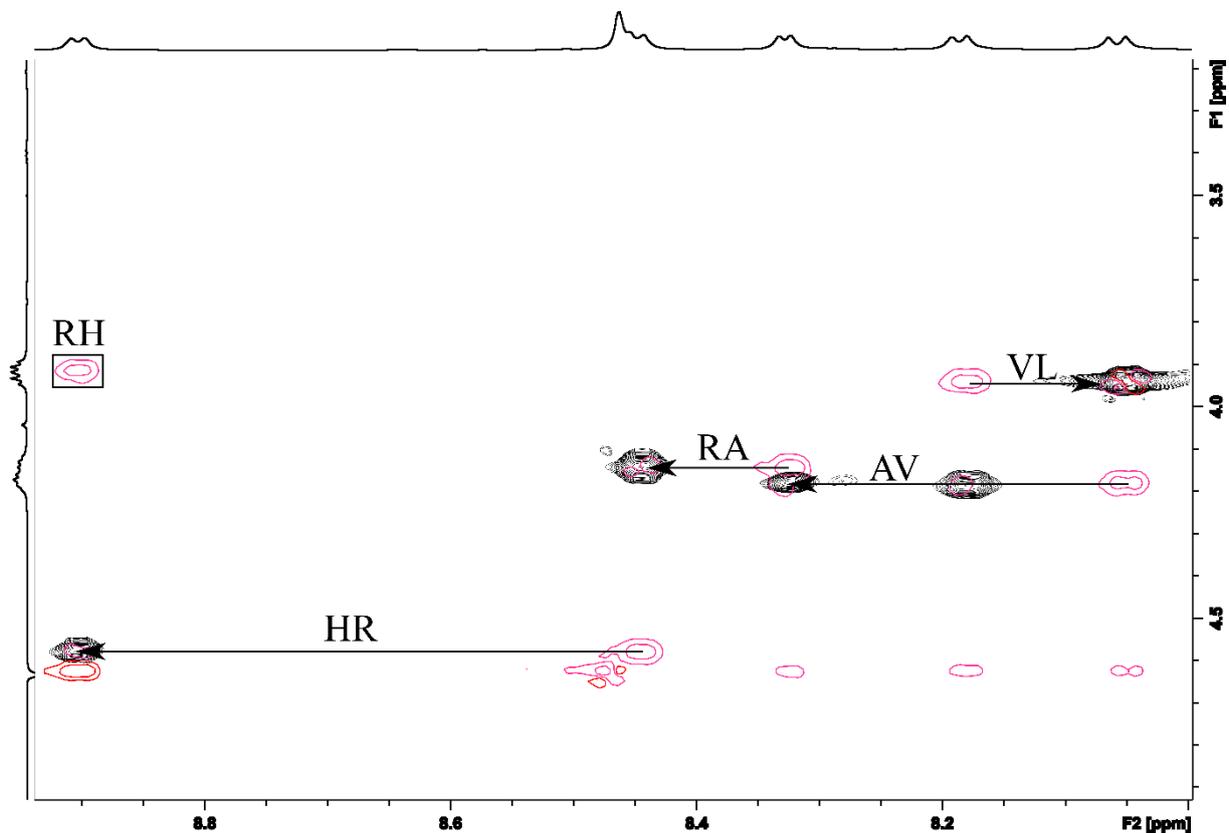


Abbildung 10: Ausschnitt der Überlagerung des ROESY- (rot) und TOCSY-Spektrums (schwarz) des Peptids RHRAVL. Gezeigt ist der Bereich von 8.0 – 9.0 ppm. Gezeigt sind die Verknüpfungen in Richtung des C-Terminus zum N-Terminus. Die Verknüpfungen können anhand von Kreuzsignalen des Amidsignals zum H- α -Signal der nächsten Aminosäure identifiziert werden. Die Kette startet mit der Verknüpfung des Leucins und Valins (VL), gefolgt von der Verknüpfung des Valins zum Alanin (AV), der Verknüpfung des Alanins zum Arginin (RA), der Verknüpfung des Arginins zum Histidin (HR) und der Verknüpfung des Histidins zum N-terminalen Arginin (RH).

5.4.2 Synthese des Peptids RHRKVL

Das Peptid RHRKVL wurde mittels Festphasensynthese nach MERRIFIELD synthetisiert. Die Bestimmung der Rohausbeute erfolgte durch UV-Absorptionsmessung des bei der letzten Entschützung entstehenden Fluorens. Es wurde eine Stoffmenge von 37.6 μmol Fluoren erhalten, was auf eine Rohausbeute von 53% schließen lässt. Das synthetisierte Peptid wurde von Harz abgespalten, durch eine Etherextraktion Verunreinigungen entfernt und das Rohprodukt gefriergetrocknet. Es wurden 35.0 mg des Rohprodukts mittels HPLC gereinigt. Die Detektion des Produktes erfolgte sowohl UV-spektroskopisch als auch massenspektrometisch.

Die Fraktionen mit einer Retentionszeit von 6-10 Minuten wurde aufgefangen. Die dabei detektierten Masse/Ladungsverhältnisse von 807.5 ($M+H^+$), 404.7 ($M+2H^+$), 269.9 ($M+3H^+$) und 202.6 ($M+4H^+$) entsprechen den erwarteten Masse/Ladungsverhältnissen für das Peptid RHRKVL mit einer Molekülmasse von 806.53 g/mol. Die Fraktion wurde gefriergetrocknet und es wurden 9.4 mg farbloses Pulver erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 27%. Die Identifikation des Peptids erfolgte mittels NMR-Spektroskopie. Das Produkt wurde dazu in H_2O/D_2O 9:1 (pH = 3) gelöst. Es wurden ein TOCSY- sowie ein ROESY-Spektrum zur Zuordnung der Signale sowie der Verknüpfung der Aminosäuren verwendet.

Anhand des TOCSY-Spektrums lässt sich die Zusammensetzung des Peptids bestimmen. Es wurden die typischen Spinsysteme für ein Arginin, ein Histidin, ein Lysin, ein Valin und ein Leucin (siehe Abbildung 11) sowie ein N-terminales Arginin identifiziert.

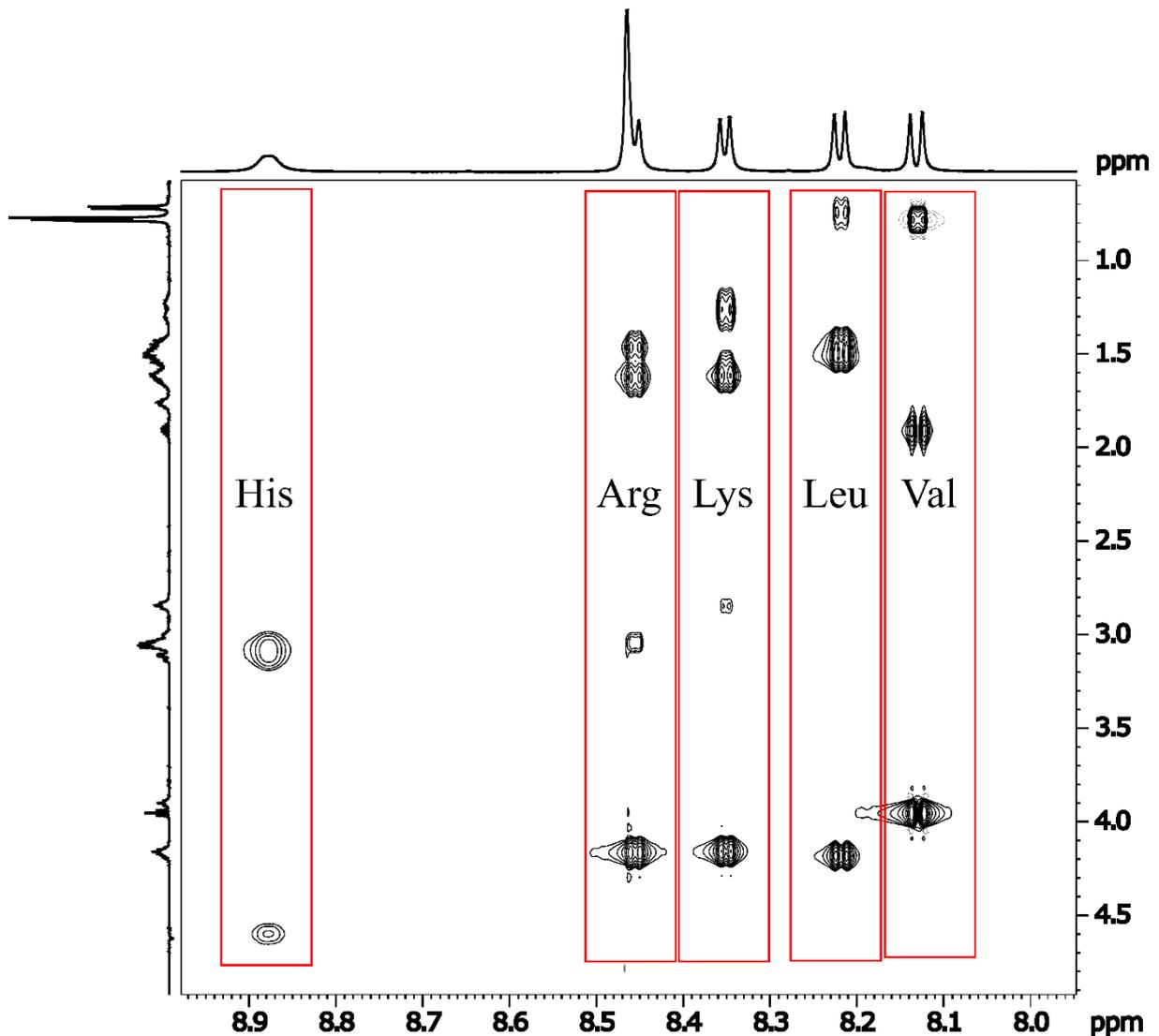


Abbildung 11: Ausschnitt des TOCSY-Spektrums des Peptids RHRKVL. Gezeigt ist der Bereich von 8.0 – 9.0 ppm. Es sind die erwarteten Spinsysteme eines Valins (8.13 ppm), eines Leucins (8.22 ppm), eines Lysins (8.35 ppm), eines Arginins (8.46 ppm) und eines Histidins (8.88 ppm) zu erkennen.

Die Verknüpfung der Aminosäuren kann durch Kreuzsignale zwischen den Amidsignalen einer Aminosäure und dem H- α -Signal der N-Terminal benachbarten Aminosäure gefolgert werden (siehe Abbildung 12). Die Kette startet mit der Verknüpfung des Leucins und Valins (VL), gefolgt von der Verknüpfung des Valins und Lysins (AK) und der Verknüpfung des Lysins und Arginins (RK). Das Signal für die Verknüpfung des Arginins und Histidins (HR) liegt sehr nah am Rauschen, welches durch die eingesetzte Unterdrückung des Lösungsmittelsignals resultiert, und ist deshalb nur sehr schwach zu erkennen. Das Signal für die Verknüpfung des Histidins mit dem N-terminalen Arginin fehlt ebenfalls. Hier könnte das Problem im zu starken Austausch des Histin-Amidprotons liegen. Die Anwesenheit eines N-terminalen Arginins lässt sich allerdings eindeutig durch eine zweite Argininspur ohne Amidsignal belegen. Dies ist

beispielsweise über das H α -Signal (3.90 ppm) oder das Signal der Guanidiniumgruppe (7.09 ppm) möglich.

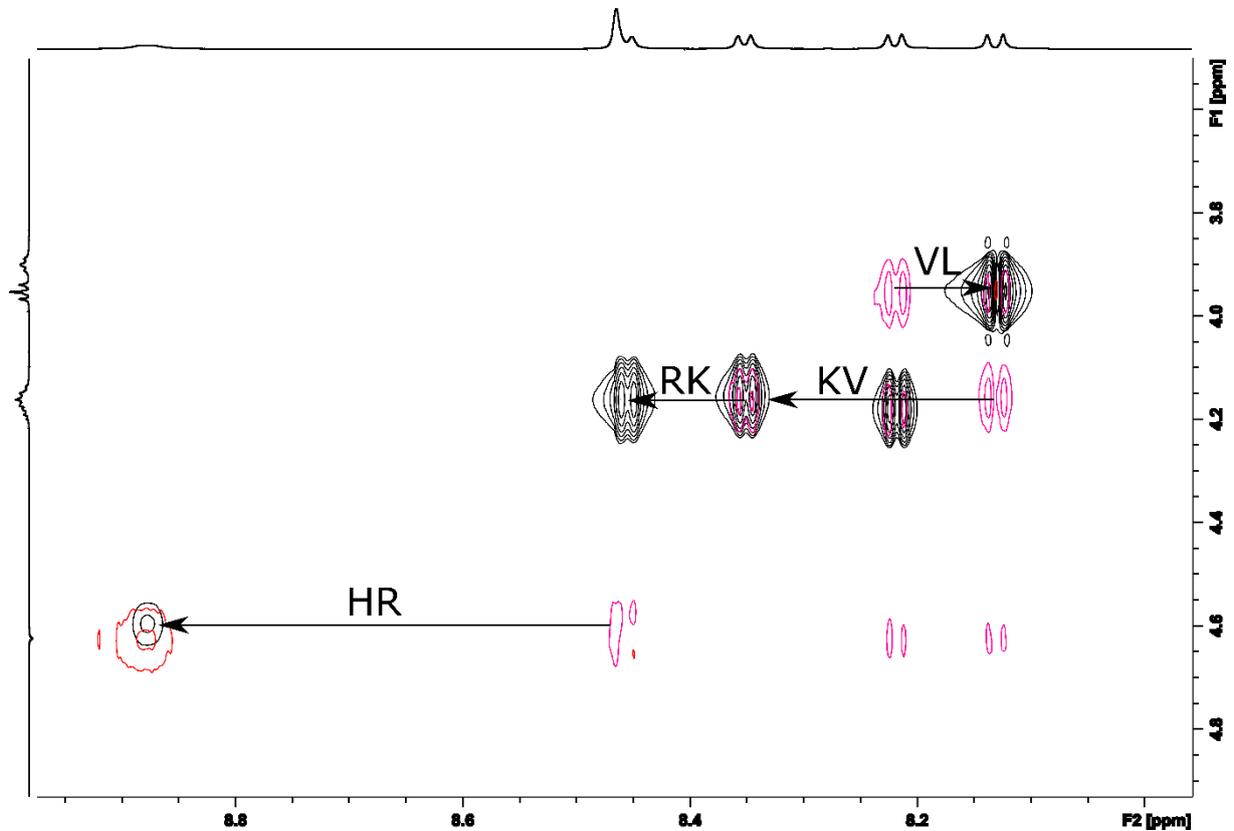


Abbildung 12: Ausschnitt der Überlagerung des ROESY- (rot) und TOCSY-Spektrums (schwarz) des Peptids RHRKVL. Gezeigt ist der Bereich von 8.0 – 9.0 ppm. Gezeigt sind die Verknüpfungen in Richtung des C-Terminus zum N-Terminus. Die Verknüpfungen können anhand von Kreuzsignalen des Amidsignals zum H- α -Signal der nächsten Aminosäure identifiziert werden. Die Kette startet mit der Verknüpfung des Leucins und Valins (VL), gefolgt von der Verknüpfung des Valins zum Lysins (KV), der Verknüpfung des Lysins zum Arginin (RK) und der Verknüpfung des Arginins zum Histidin (HR).

5.4.3 Synthese des Peptids RHRKVLRD

Das Peptid RHRKVLRD wurde mittels Festphasensynthese nach MERRIFIELD synthetisiert. Die Bestimmung der Rohausbeute erfolgte durch UV-Absorptionsmessung des bei der letzten Entschützung entstehenden Fluorens. Es wurde eine Stoffmenge von 36.2 μmol Fluoren erhalten, was auf eine Rohausbeute von 51% schließen lässt. Das synthetisierte Peptid wurde von Harz abgespalten, durch eine Etherextraktion Verunreinigungen entfernt und das Rohprodukt gefriergetrocknet. Es wurden 30 mg des Rohprodukts mittels HPLC gereinigt. Die Detektion des Produktes erfolgte sowohl UV-spektroskopisch als auch massenspektrometisch.

Die Fraktionen mit einer Retentionszeit von 5-8.5 Minuten wurde aufgefangen. Die dabei detektierten Masse/Ladungsverhältnisse von 1079.2 ($M+H^+$), 540.6 ($M+2H^+$), 360.5 ($M+3H^+$), 270.6 ($M+4H^+$) und 216.8 ($M+5H^+$) entsprechen den erwarteten Masse/Ladungsverhältnissen für das Peptid RHRKVLRD mit einer Molekülmasse von 1077.66 g/mol. Die Fraktion wurde gefriergetrocknet und es wurden 5.7 mg farbloses Pulver erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 22%. Die Identifikation des Peptids erfolgte mittels NMR-Spektroskopie. Das Produkt wurde dazu in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 ($\text{pH} = 3$) gelöst. Es wurden ein TOCSY- sowie ein ROESY-Spektrum zur Zuordnung der Signale sowie der Verknüpfung der Aminosäuren verwendet.

Anhand des TOCSY-Spektrums lässt sich die Zusammensetzung des Peptids bestimmen. Es wurden die typischen Spinsysteme für zwei Arginine, ein Histidin, ein Lysin, eine Asparaginsäure, ein Valin und ein Leucin (siehe Abbildung 13) sowie ein N-terminales Arginin identifiziert.

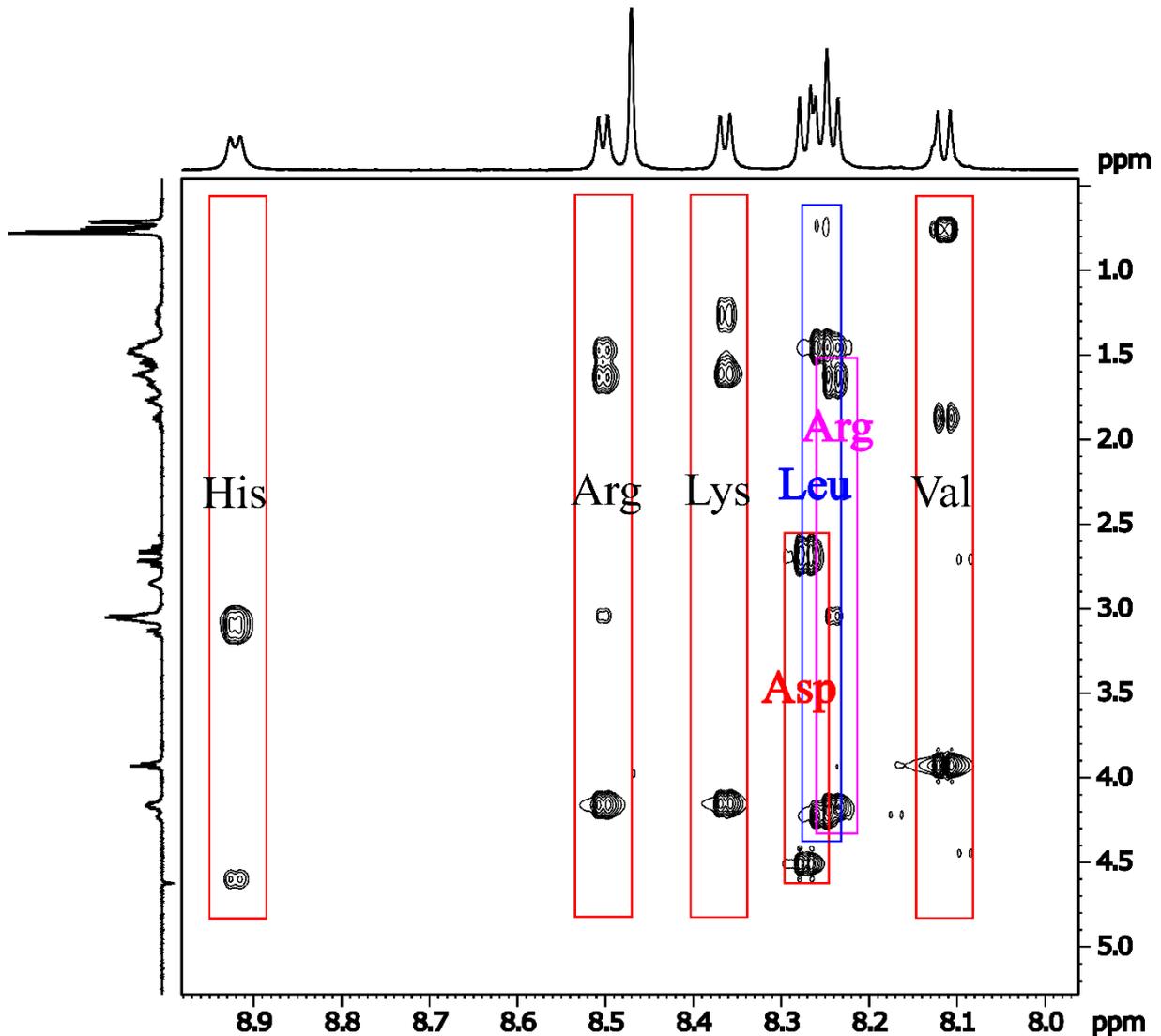


Abbildung 13: Ausschnitt des TOCSY-Spektrums des Peptids RHRKVLRD. Gezeigt ist der Bereich von 8.0 – 9.0 ppm. Es sind die erwarteten Spinsysteme eines Valins (8.11 ppm), eines Leucins (8.25 ppm, blau), eines Lysins (8.36 ppm), zweier Arginine (8.50 ppm und 8.24 ppm, magenta), einer Asparaginsäure (8.27 ppm, rot) und eines Histidins (8.92 ppm) zu erkennen.

Die Verknüpfung der Aminosäuren kann durch Kreuzsignale zwischen den Amidsignalen einer Aminosäure und dem H- α -Signal der N-Terminal benachbarten Aminosäure gefolgert werden (siehe Abbildung 14). Die Kette startet mit der Verknüpfung des Aspartats und Arginins (RD), gefolgt von der Verknüpfung des Arginins und Leucins (LR), der Verknüpfung des Leucins und Valins (VL), der Verknüpfung des Valins und Lysins (AK) und der Verknüpfung des Lysins und dem zweiten Arginin (RK). Das Signal für die Verknüpfung des zweiten Arginins und Histidin (HR) liegt genau im Bereich des Störsignals der Lösungsmittelunterdrückung und es ist deshalb nur als Interferenz des gleichmäßigen Störsignals zu erkennen. Das Signal für die Verknüpfung des Histidins mit dem dritten, N-terminalen Arginin (RH) ist ebenfalls nicht zu erkennen. Es lässt sich jedoch aus der Anwesenheit der TOCSY-Spuren des H α -Signals

(3.92 ppm) und des Signals der Guanidiniumgruppe (7.14 ppm) eindeutig ein drittes, N-terminales Arginin nachweisen.

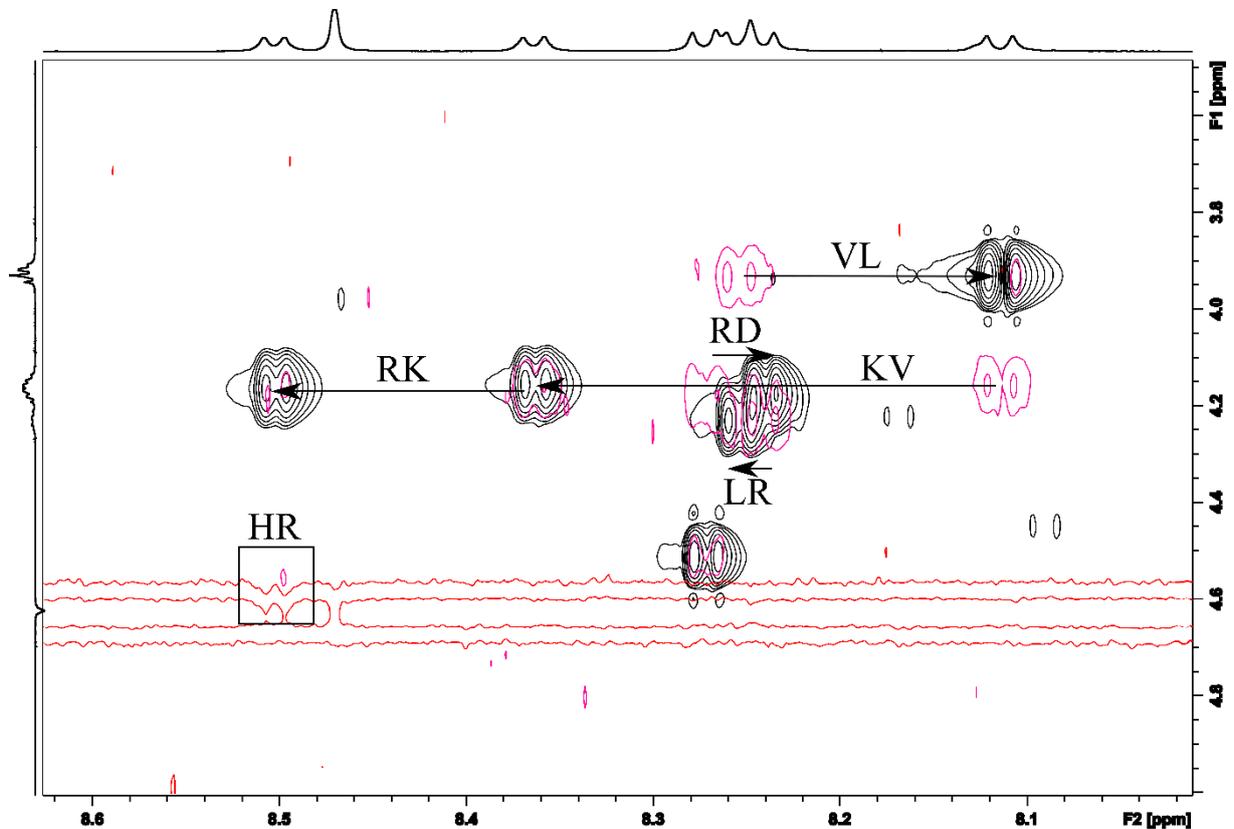


Abbildung 14: Ausschnitt der Überlagerung des ROESY- (rot) und TOCSY-Spektrums (schwarz) des Peptids RHRKVLRD. Gezeigt ist der Bereich von 8.0 – 8.8 ppm. Gezeigt sind die Verknüpfungen in Richtung des C-Terminus zum N-Terminus. Die Verknüpfungen können anhand von Kreuzsignalen des Amidsignals zum H- α -Signal der nächsten Aminosäure identifiziert werden. Die Kette startet mit der Verknüpfung des Aspartats zum Arginin (RD), gefolgt von der Verknüpfung des Arginins und Leucins (LR), des Leucins und Valins (VL), des Valins zum Lysins (KV) und der Verknüpfung des Lysins und zweiten Arginins (RK). Die Verknüpfung zwischen Arginin und Histin (HR, schwarzes Viereck) ist als Interferenz des Störsignals aus der Signalunterdrückung des Lösungsmittels zu erahnen.

5.4.4 Synthese des Peptids AKRHRKVLRD

Die Synthese des Peptids AKRHRKVLRD wurde bereits in einer früheren Arbeit durchgeführt und beschrieben (49).

5.5 Bindungsstudien

5.5.1 Untersuchung der Bindung der Peptide RHRKVL und RHRAVL an die Methyltransferase Set8

Das Peptid RHRKVL stellt als Ausschnitt das minimale Bindungsmotiv des Histons 4 dar um eine Bindung mit der Methyltransferase Set8 einzugehen. Das Peptid RHRAVL ist diesem Motiv nachempfunden, jedoch wurde das zur Methylierung nötige Lysin durch ein Alanin ersetzt. Es sollte dementsprechend als kompetitiver Inhibitor der Methyltransferase Set8 wirken. Es wurden STD-Experimente mit beiden Peptiden durchgeführt, um die Bindung zu untersuchen.

Sowohl das Peptid RHRKVL als auch das Peptid RHRAVL (siehe Abbildung 15) zeigten in ersten Messungen deutliche STD-Signale. Es sind dabei unterschiedlich starke Signale auf allen Seitenketten und einigen Protonen des Peptidbackbones zu erkennen.

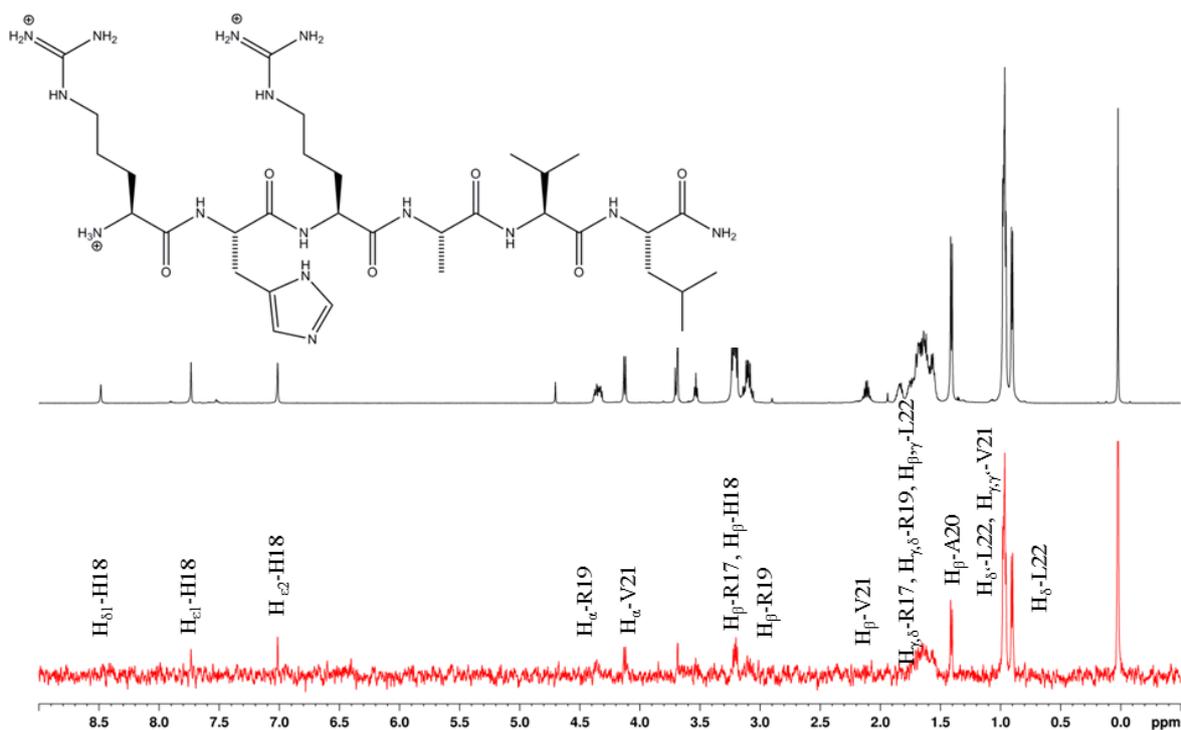


Abbildung 15: Vergleich des *off-res* Spektrums des Peptids RHRAVL ohne Sättigungspuls (oben, schwarz) und des Differenzspektrums (unten, rot), welches durch die Subtraktion des *on-res* Spektrums mit Sättigungspuls vom *off-res* Spektrum erhalten wird.

Genauere Untersuchungen der STD-Signale zeigten allerdings, dass ein Großteil der Signale durch Artefakte zustande kam und nicht durch eine spezifische Bindung mit der Methyltransferase Set8 (siehe Abbildung 16).

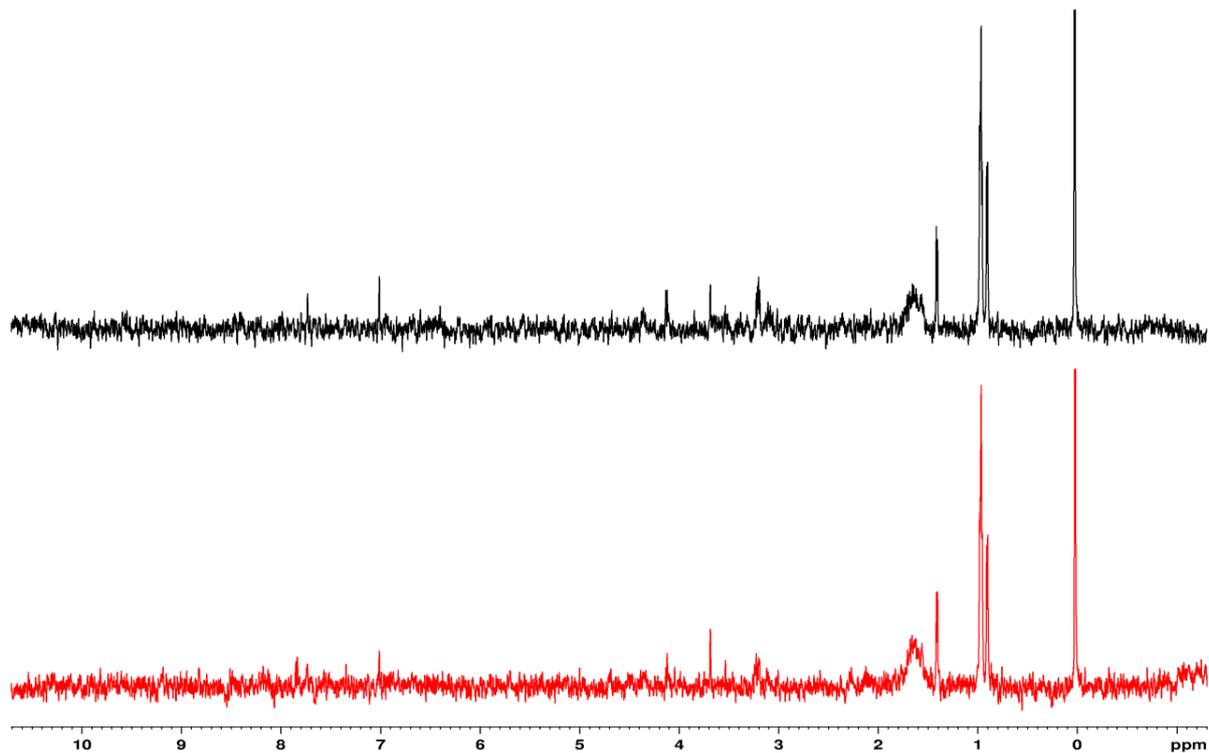


Abbildung 16: Vergleich der Differenzspektren des Peptids RHR AVL bei gleicher Peptidkonzentration in Anwesenheit des Proteins Set8 (oben, schwarz) und ohne Protein Set8 (unten, rot).

Obwohl noch leichte Unterschiede in den Signalintensitäten zu erkennen sind, ist eine Bereinigung der STD-Spektrum um die Artefakte und folgende Auswertung nicht möglich gewesen.

Es konnte ferner beobachtet werden, dass die Artefakte sich mit der Konzentration veränderten. Dies deutet darauf hin, dass Mizellbildung bei der Entstehung der Artefakte eine Rolle spielen kann. Ein deutlicher Hinweis auf die Bildung von Mizellen ist eine Verschiebung der NMR-Signale in Abhängigkeit der Konzentration. Dies war bei mehreren Signalen in unterschiedlicher Ausprägung zu beobachten. In Abbildung 17 ist dies für die NMR-Signale bei 7.777 ppm und 7.025 ppm dargestellt. Für das Signal bei 7.777 ppm bei einer Peptidkonzentration von 41 μM RHR AVL ist eine Veränderung von -0.025 ppm nach 7.752 ppm bei einer Peptidkonzentration von 275 μM zu beobachten. Für das Signal bei 7.025 ppm eine Veränderung von -0.013 ppm nach 7.012 ppm bei höchster Konzentration.

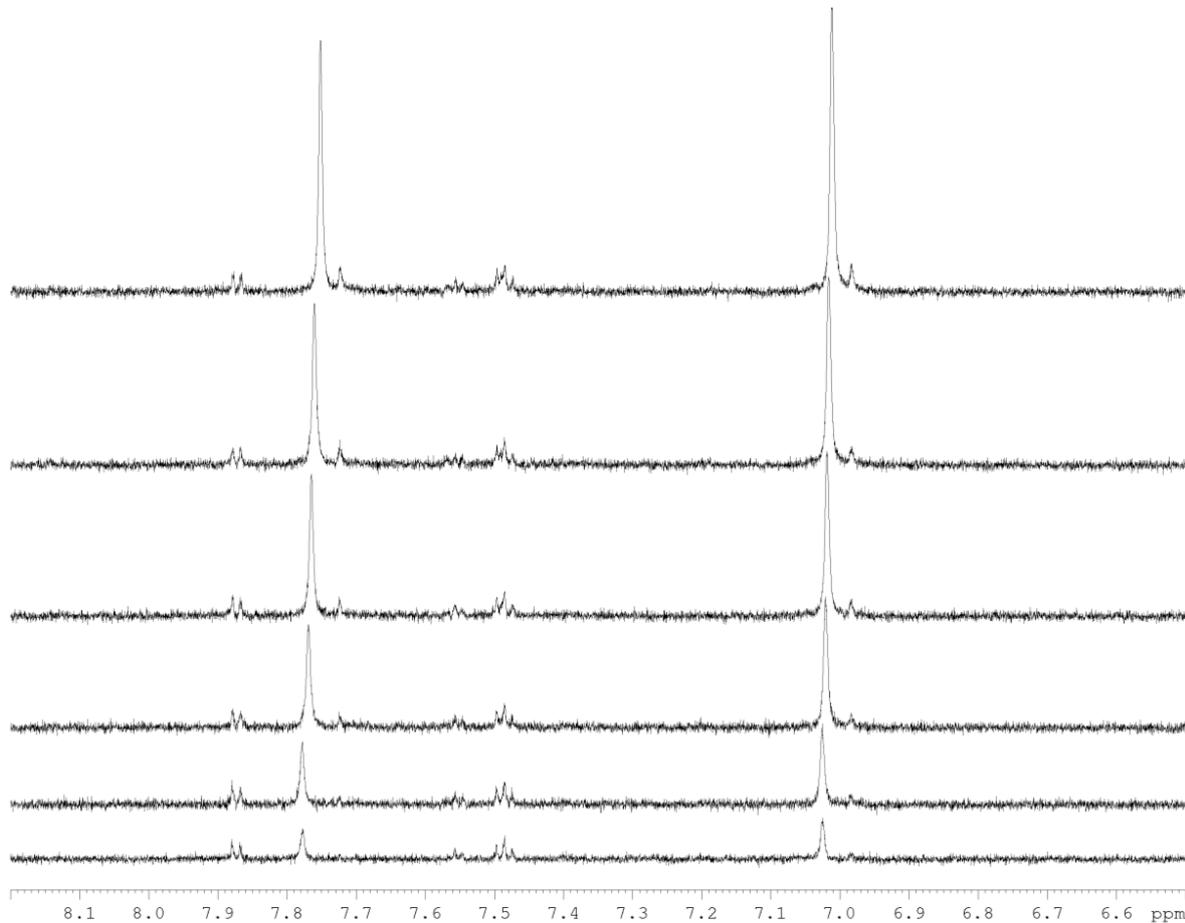


Abbildung 17: Vergleich der NMR-Spektren des Peptids RHR AVL bei unterschiedlicher Konzentration. Gezeigt ist der Bereich von 6.5-8.2 ppm. Die Spektren (von unten nach oben) wurden mit Peptidkonzentrationen von 41 μM , 81 μM , 120 μM , 159 μM , 198 μM und 263 μM aufgenommen.

Trägt man die chemische Verschiebung gegen die Konzentration auf, so ist deutlich zu erkennen, dass bei Erhöhung der Peptidkonzentration über 77 μM eine Verschiebung der Signale eintritt (siehe Abbildung 18). Eine Zugabe von bis 10% DMSO-*d*₆ konnte dieses Verhalten des Peptids nicht verhindern.

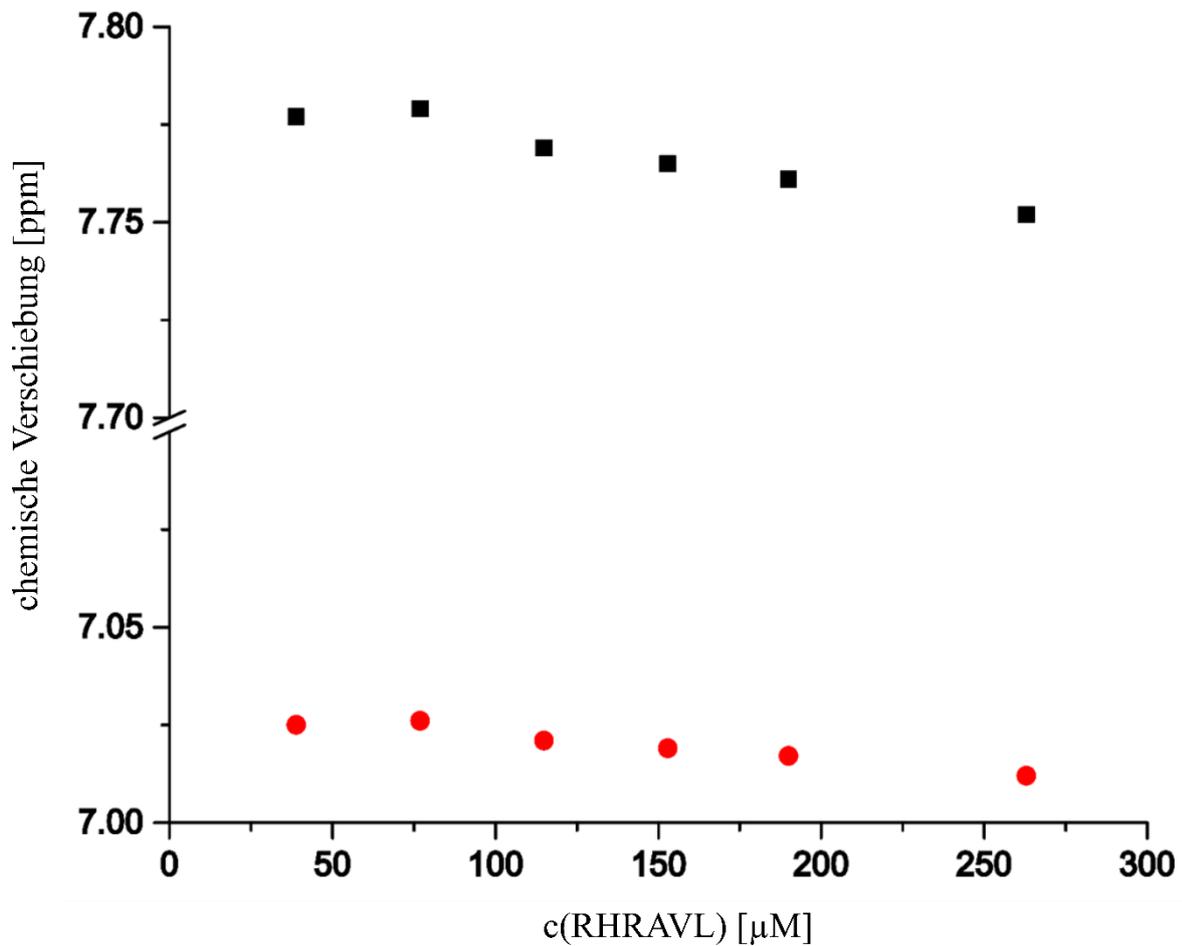


Abbildung 18: Auftragung der chemischen Verschiebung zweier Protonensignale des Peptids RHR AVL in Abhängigkeit der Konzentration.

Aufgrund des hydrophilen N-Terminus und des hydrophoben C-Terminus des Peptids RHR AVL ist eine Mizellbildung auch zu erklären. Die Sättigung der NMR-Signale ist größtenteils auf diese Mizellbildung zurückzuführen. Der Effekt ist so groß, dass eine Auswertung der wohl auch vorhandenen Sättigung durch Protein-Ligand-Interaktionen nicht mehr bestimmt werden kann.

5.5.2 Untersuchung der Bindung des Peptids RHRKVLRD an die Methyltransferase Set8

Die Bindung des Peptids RHRKVLRD, welches einen etwas längeren Ausschnitt der Aminosäuresequenz des Histons 4 mit dem minimalen Bindungsmotiv darstellt, wurde mittels STD-NMR und eines Thermophorese-Essays untersucht.

Es zeigte sich sehr schnell, dass auch das Peptid RHRKVLRD zu Mizellbildung neigt. Die beiden zusätzlichen hydrophilen Aminosäurereste des Arginins und der Asparaginsäure am C-Terminus reichen nicht aus um dies zu verhindern. Es wurden wieder große konzentrationsabhängige Artefakte während der STD-NMR-Messungen beobachtet (siehe Abbildung 19) und es konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Verschiebung verschiedener Signale beobachtet werden (siehe Abbildung 20).

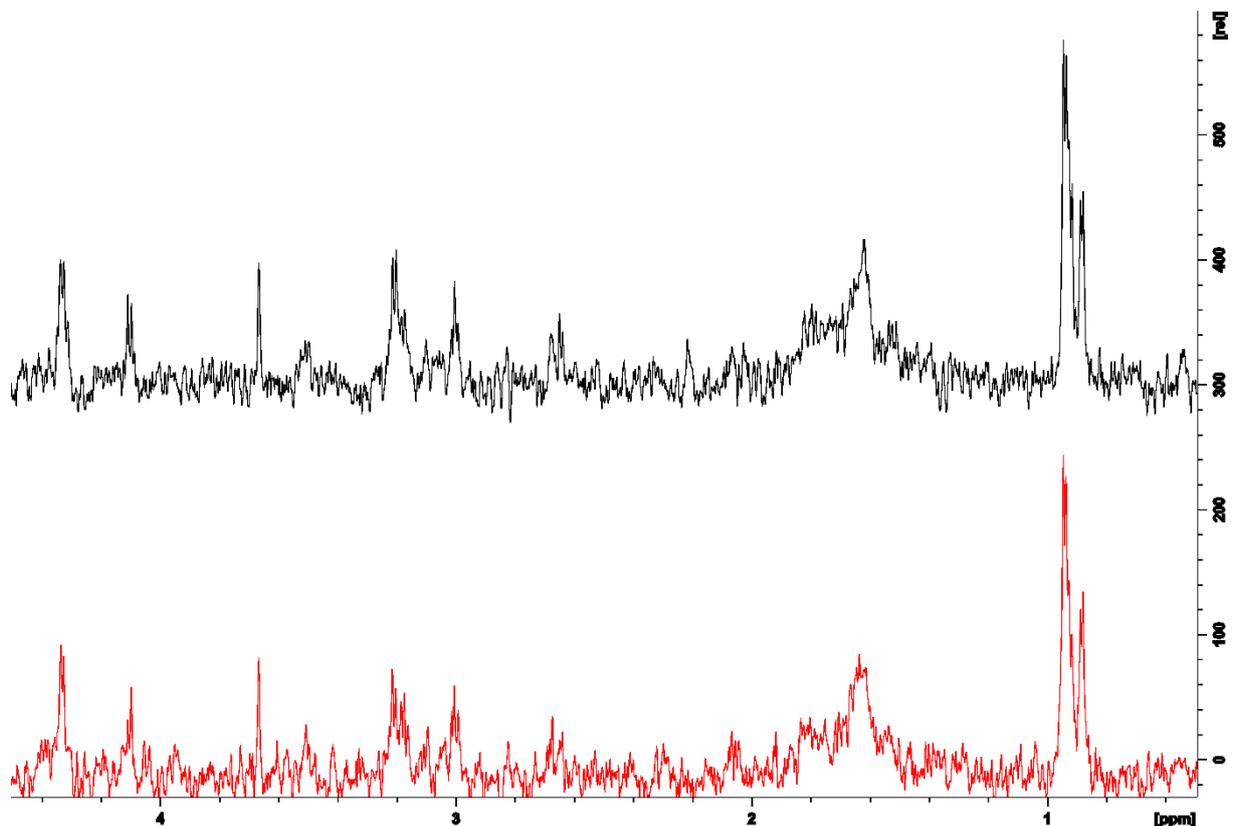


Abbildung 19: Vergleich der Differenzspektren des Peptids RHRKVLRD bei gleicher Peptidkonzentration in Anwesenheit des Proteins Set8 (oben, schwarz) und ohne Protein Set8 (unten, rot).

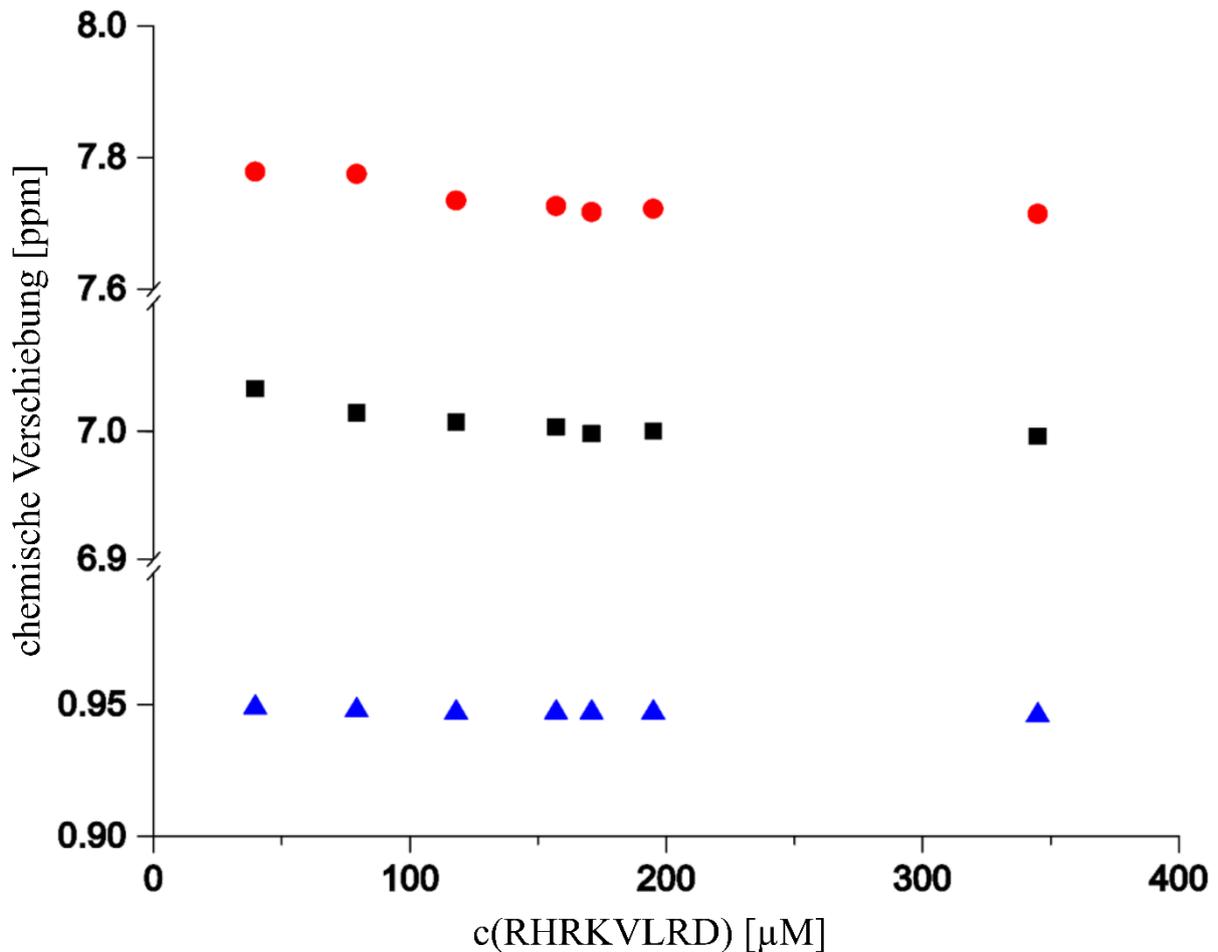


Abbildung 20: Auftragung der chemischen Verschiebung dreier Protonensignale des Peptids RHRKVLRD in Abhängigkeit der Konzentration.

Ein Thermophorese-Essay zur Bestimmung der Dissoziationskonstante des Peptids RHRKVLRD an Set8 wurde in Zusammenarbeit mit der Firma NANOTEMPER durchgeführt. Ein Vortest ergab eine signifikante Fluoreszenz des Peptidliganden weshalb es nötig war, die Methyltransferase Set8 mit dem Fluoreszenzfarbstoff NT-647 zu markieren, was mit dem entsprechendem Labelkit des Geräteanbieters durchgeführt wurde.

Die Enzymkonzentration wurde über alle Experimente konstant bei $0.3 \mu\text{M}$ gehalten und die Konzentration des Liganden zwischen 0.02 nM und $750 \mu\text{M}$ variiert. Die Experimente wurden in 50 mM Tris-Puffer durchgeführt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Monolith NT.115 gemessen. Die Fluoreszenz wurde gegen die Konzentration aufgetragen und ein $K_D = 241 \mu\text{M}$ bestimmt (siehe Abbildung 21).

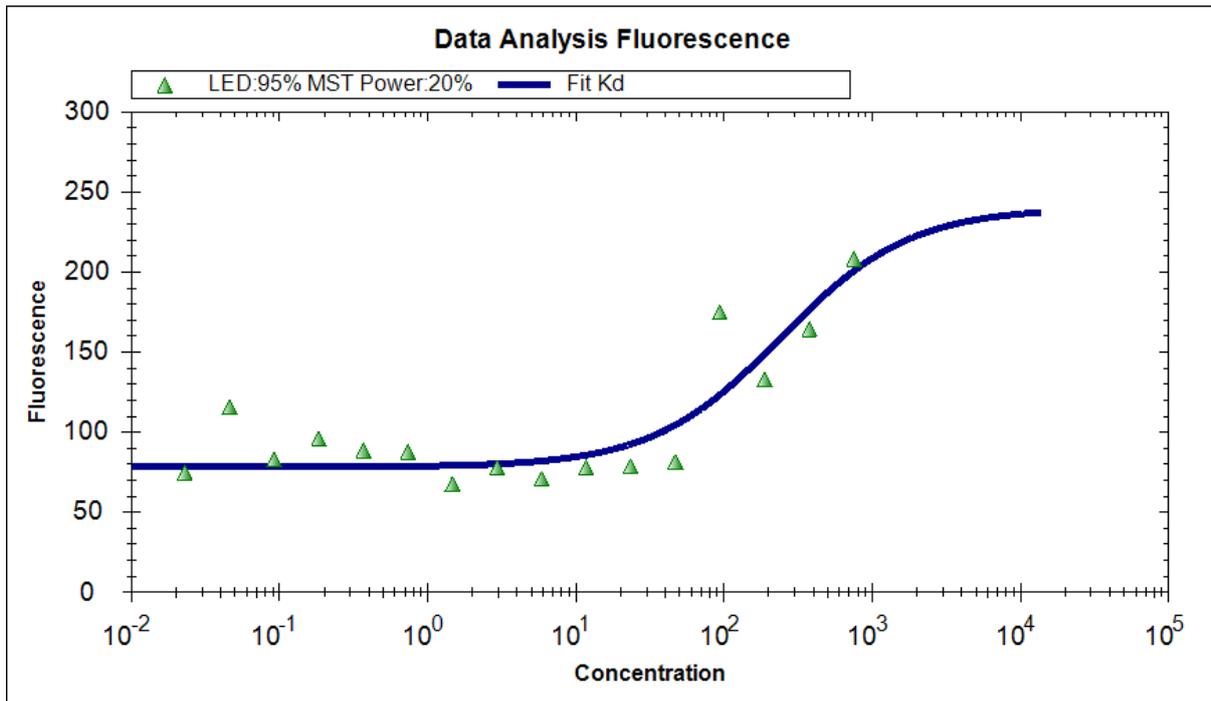


Abbildung 21: Auftragung der Fluoreszenz gegen die Konzentration (in μM). In blau ist der berechnete Fit für das Bindungsereignis von RHRKVLRD an die NT-647 markierte Methyltransferase Set8 dargestellt. Es ergibt sich ein $K_D = 241 \mu\text{M}$.

Eine genauere Betrachtung der Kurvenanpassung aus Abbildung 21 ergibt, dass noch keine Sättigung erreicht wurde, der K_D -Wert also noch höher liegen kann. Dies kann durch die Methode geschuldet sein, da der verwendete Fluoreszenzfarbstoff NT-647 unspezifisch an Lysine des Proteins bindet und dadurch auch die Bindungstasche der Methyltransferase Set8 beeinflussen kann. Dies konnte jedoch weder widerlegt noch bestätigt werden.

5.6 Kinetische Untersuchung der Methyltransferase SET8

Die Methyltransferase SET8 überträgt eine Methylgruppe vom Donor *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf die terminale Aminogruppe eines Lysins in einem Peptid der Sequenz RHRKVL. Diese Reaktion kann sehr gut mittels NMR-Spektroskopie anhand des entstehenden Signals für die Methylgruppe des methylierten Lysins bei 2.72 ppm verfolgt werden. Eine Komplikation ist jedoch der Zerfall von SAM, dessen Zerfallsprodukt zur Entstehung eines Triplets in direkter Nachbarschaft zu diesem Signal des *N*-Methyls führt (siehe Abbildung 22). Das Triplett ist jedoch perfekt symmetrisch und lässt sich somit gut durch teilweise Integration vom Integral des *N*-Methylsignal subtrahieren.

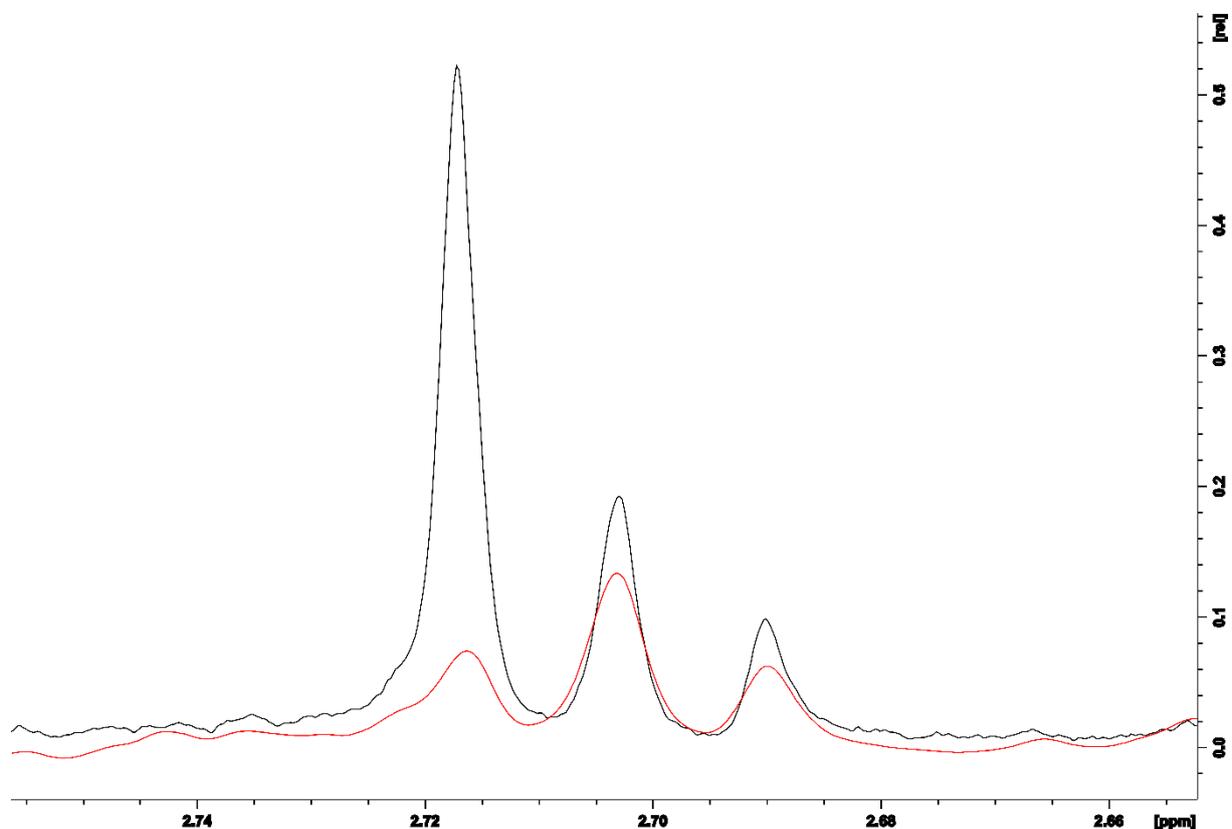


Abbildung 22: Ausschnitt des Spektrums einer typischen Reaktionsverfolgung (schwarz) und des Spektrums von SAM (rot). Das Signal bei 2.72 ppm entsteht durch die Methylierung der N-terminalen Aminogruppe des Lysins und wird durch das symmetrische Triplett des SAM-Zerfallsprodukts überlagert.

Die Quantifizierung der Integrale und Umrechnung in Konzentrationen erfolgt über den internen Standard Trimethylsilylpropionsäure (TMSP). Zur Bestimmung von Korrekturfaktoren, welche die Relaxationseffekte auf die Signalintensität bei kurzen *D1*-delays berücksichtigen, wurden NMR-Experimente mit unterschiedlich langen *D1* durchgeführt.

Mit Hilfe dieser Korrekturfaktoren lässt sich die Konzentration nach Formel 11 bestimmen:

$$[X] = \frac{I_{X,abs} \cdot F_X \cdot n_X^{-1}}{I_{TMSP,abs} \cdot F_{TMSP} \cdot n_{TMSP}^{-1}} \cdot [TMSP]$$

Formel 11: Berechnung der Konzentration einer Substanz X unter Berücksichtigung des Relaxationsbedingten Korrekturfaktors. Mit $[X]$ = Konzentration der Substanz X, $I_{X,abs}$ = absolutes Integral der Substanz X, F_X = Korrekturfaktor für das Integral der Substanz X, n_X = Anzahl der chemisch äquivalenten Protonen des Signals der Substanz X, $I_{TMSP,abs}$ = absolutes Integral des TMSP, F_{TMSP} = Korrekturfaktor für das Integral des TMSP, n_{TMSP} = Anzahl der chemisch äquivalenten Protonen des Signals des TMSP, $[TMSP]$ = Konzentration des TMSP.

Aus den Relaxationsmessungen ergaben sich die Faktoren 2.117 für die Methylgruppen des TMSP, 1.034 für die Methylgruppen der Peptidseitenketten des Leucins, Alanins und Valins, sowie 1.094 für die Methylgruppe des methylierten Lysins im Produkt.

5.6.1 Umsetzung des Peptids AKRHRKVLRD durch die Methyltransferase SET8

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Umsetzung des Peptids AKRHRKVLRD durch die Methyltransferase erfolgte aus einer NMR-spektroskopischen Messung mit einer Enzymkonzentration SET8 von $10.5 \mu\text{M}$, $350 \mu\text{M}$ AKRHRKVLRD, 4.7 mM SAM und $100 \mu\text{M}$ TMSP als Referenzsubstanz. Die Konzentration des Peptid AKRHRKVLRD wurde dabei anhand der Signalintensitäten der Methylgruppen des Leucins und Valins bei 0.87 ppm bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration des methylierten Peptids erfolgte aus dem Integral der *N*-Methylgruppe des Lysins bei 2.72 ppm . Die benötigte Substratkonzentration $[S]_t$ ergibt sich aus der Startkonzentration $[S]_0$ des Peptids ($350 \mu\text{M}$) abzüglich der berechneten Konzentration $[P]_t$ des methylierten Produkts zum Zeitpunkt t .

Die Auftragung des Substratkonzentration-Zeit-Verlaufs (siehe Abbildung 23) und die Kurvenanpassung durch die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung mit der Lambert W-Lösung lieferte eine apparente Michaelis-Menten-Konstante $K'_M = 523 \pm 250 \mu\text{M}$ und eine apparente maximale Geschwindigkeit $v'_{max} = 246 \pm 115 \text{ nM/s}$.

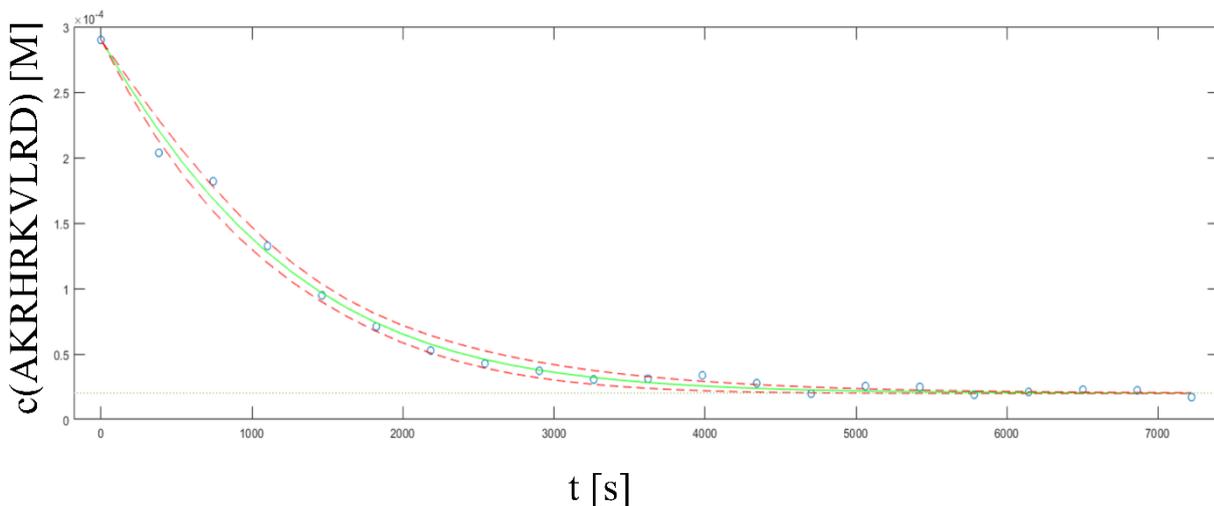


Abbildung 23: Auftragung des Konzentration-Zeitverlaufs der Umsetzung des Peptids AKRHRKVLRD und der Kurvenanpassung mittels der Lambert W-Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung.

5.6.2 Umsetzung des Peptids RHRKVLRD durch die Methyltransferase SET8

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Umsetzung des Peptids RHRKVLRD durch die Methyltransferase erfolgte aus einer NMR-spektroskopischen Messung mit einer Enzymkonzentration SET8 von 10.5 μM , 350 μM RHRKVLRD, 4.7 mM SAM und 100 μM TMSP als Referenzsubstanz. Die Konzentration des Peptid RHRKVLRD wurde dabei anhand der Signalintensitäten der Methylgruppen des Leucins und Valins bei 0.87 ppm bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration des methylierten Peptids erfolgte aus dem Integral der *N*-Methylgruppe des Lysins bei 2.72 ppm. Die benötigte Substratkonzentration $[S]_t$ ergibt sich aus der Startkonzentration $[S]_0$ des Peptids (350 μM) abzüglich der berechneten Konzentration $[P]_t$ des methylierten Produkts zum Zeitpunkt t .

Die Auftragung des Substratkonzentration-Zeit-Verlaufs (siehe Abbildung 24) und die Kurvenanpassung durch die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung mit der Lambert W-Lösung lieferte eine apparente Michaelis-Menten-Konstante $K'_M = 329 \pm 23 \mu\text{M}$ und eine apparente maximale Geschwindigkeit $v'_{max} = 50 \pm 14 \text{ nM/s}$.

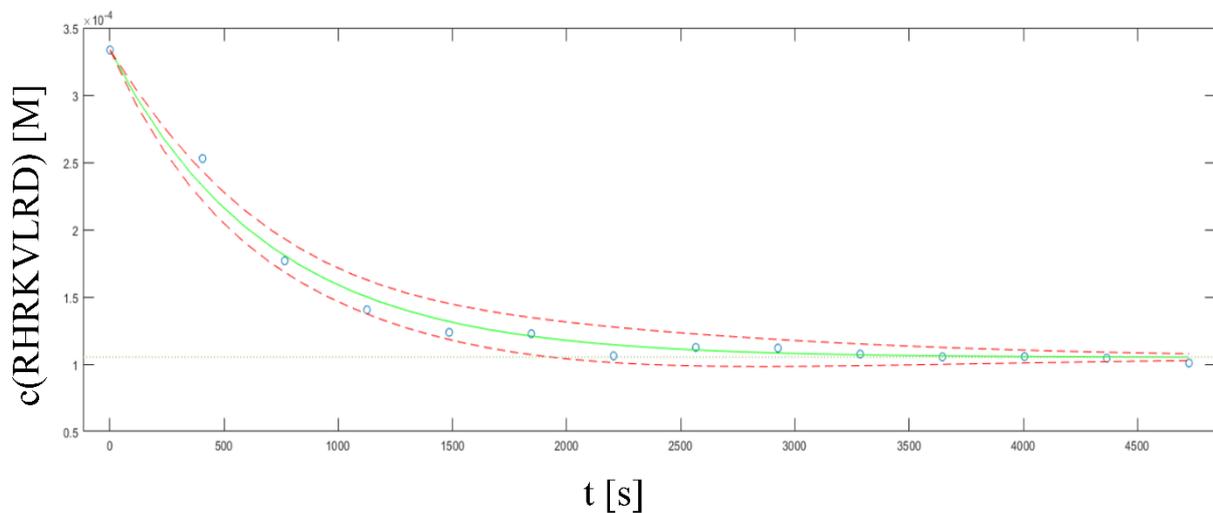


Abbildung 24: Auftragung des Konzentration-Zeitverlaufs der Umsetzung des Peptids RHRKVLRD und der Kurvenanpassung mittels der Lambert W-Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung.

5.6.3 Umsetzung des Peptids RHRKVL durch die Methyltransferase SET8

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Umsetzung des Peptids RHRKVL durch die Methyltransferase erfolgte aus einer NMR-spektroskopischen Messung mit einer Enzymkonzentration SET8 von $3.2 \mu\text{M}$, $218 \mu\text{M}$ RHRKVL, 4.8 mM SAM und $350 \mu\text{M}$ TMSP als Referenzsubstanz. Die Konzentration des Peptid RHRKVL wurde dabei anhand der Signalintensitäten der Methylgruppen des Leucins und Valins bei 0.87 ppm bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration des methylierten Peptids erfolgte aus dem Integral der *N*-Methylgruppe des Lysins bei 2.72 ppm . Die Umsetzung erreichte ein Maximum von $186 \mu\text{M}$ Produkt, was für die Kurvenanpassung mittels der Lambert-W-Funktion berücksichtigt werden musste. Die benötigte Substratkonzentration $[S]_t$ ergibt sich aus der Startkonzentration $[S]_0$ des Peptids ($218 \mu\text{M}$) abzüglich der berechneten Konzentration $[P]_t$ des methylierten Produkts zum Zeitpunkt t .

Die Auftragung des Substratkonzentration-Zeit-Verlaufs (siehe Abbildung 25) und die Kurvenanpassung durch die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung mit der Lambert W-Lösung lieferte eine apparente Michaelis-Menten-Konstante $K'_M = 261 \pm 12 \mu\text{M}$ und eine apparente maximale Geschwindigkeit $v'_{max} = 31.7 \pm 2.5 \text{ nM/s}$.

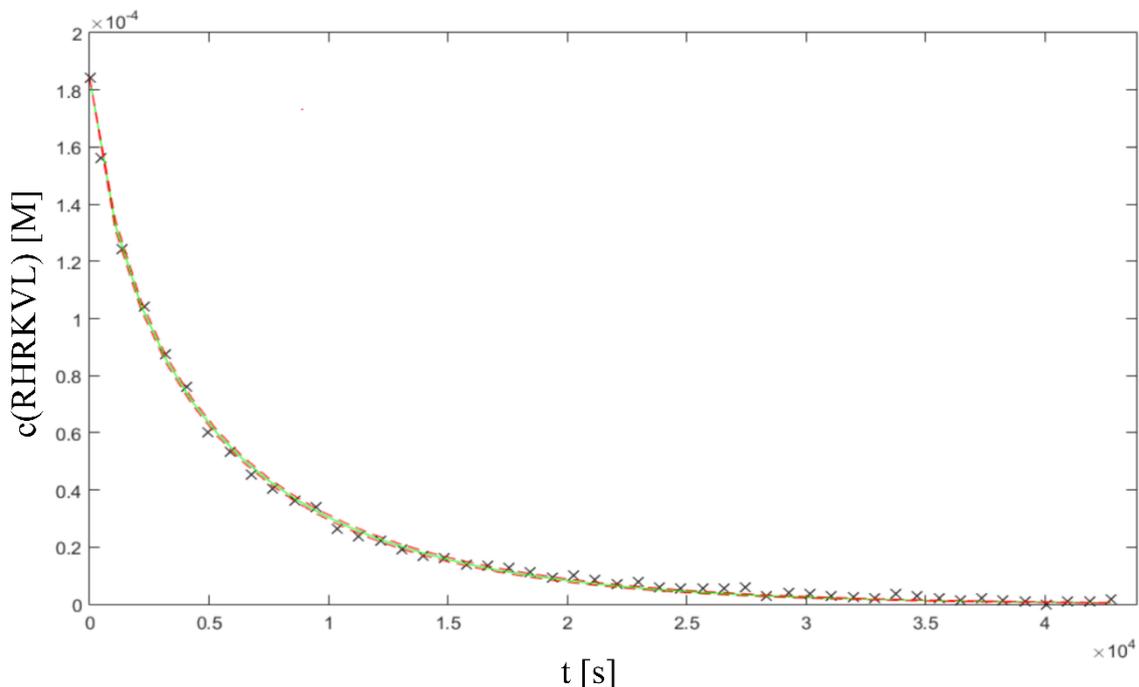


Abbildung 25: Auftragung des Konzentration-Zeitverlaufs der Umsetzung des Peptids RHRKVL und der Kurvenanpassung mittels der Lambert W-Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung.

5.6.4 Inhibition der Umsetzung des Peptids RHRKVL durch die Methyltransferase SET8 durch das Analogon RHRAVL

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Umsetzung des Peptids RHRKVL in Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors RHRAVL durch die Methyltransferase erfolgte aus einer NMR-spektroskopischen Messung mit einer Enzymkonzentration SET8 von 3.2 μM , 247 μM RHRKVL, 209 μM RHRAVL, 4.8 mM SAM und 350 μM TMSP als Referenzsubstanz. Die Gesamtkonzentration der Peptide RHRKVL und RHRAVL wurde dabei anhand der Signalintensitäten der Methylgruppen der Leucine und Valine bei 0.87 ppm bestimmt. Es ergab sich eine Gesamtkonzentration von 456 μM . Die Konzentration des Peptids RHRAVL wurde anhand der Methylgruppe des Alanins bei 1.35 ppm auf 209 μM bestimmt woraus sich für die Konzentration des Peptids RHRKVL ein Wert von 247 μM errechnet. Die Bestimmung der Konzentration des methylierten Peptids erfolgte aus dem Integral der *N*-Methylgruppe des Lysins bei 2.72 ppm. Die Umsetzung erreichte ein Maximum von 161 μM Produkt, was für die Kurvenanpassung mittels der Lambert-W-Funktion berücksichtigt werden musste. Die benötigte Substratkonzentration $[S]_t$ ergibt sich aus der Startkonzentration $[S]_0$ des Peptids (247 μM) abzüglich der berechneten Konzentration $[P]_t$ des methylierten Produkts zum Zeitpunkt t .

Die Auftragung des Substratkonzentration-Zeit-Verlaufs (siehe Abbildung 26) und die Kurvenanpassung durch die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung mit der Lambert W-Lösung lieferte eine apparente Michaelis-Menten-Konstante $K'_M = 1.20 \pm 0.50$ mM und eine apparente maximale Geschwindigkeit $v'_{max} = 103 \pm 55$ nM/s.

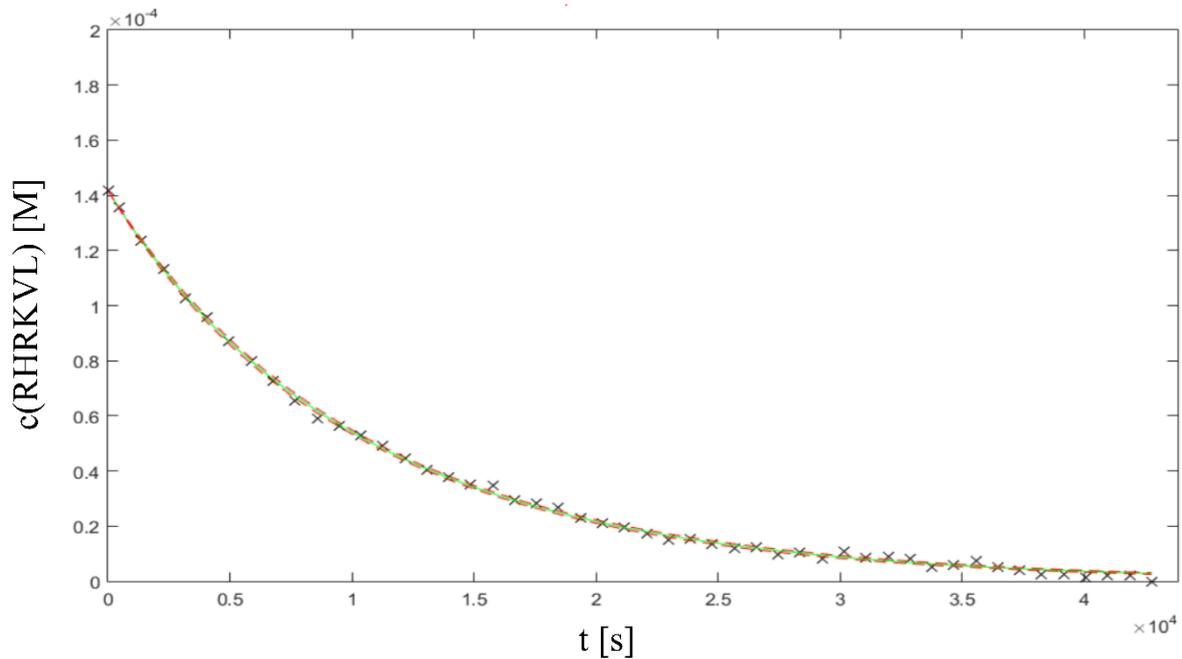


Abbildung 26: Auftragung des Konzentration-Zeitverlaufs der Umsetzung des Peptids RHRKVL in Anwesenheit des Peptids RHRAVL und der Kurvenanpassung mittels der Lambert W-Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung.

Die Lösung der Lambert W-Funktion von Goudar *et al.* (Formel 12) ermöglicht auch die Analyse einer kompetitiven Inhibition (15,16,50).

$$[S] = K'_M W \left\{ \frac{[S]_0}{K'_M} \exp \left(\frac{[S]_0 - v'_{\max} t}{K'_M} \right) \right\}$$

Formel 12: Integrierte Michaelis-Menten Gleichung mit Lambert W-Funktion. Aufgelöst nach der Abhängigkeit der Substratkonzentration von der Reaktionszeit.

Die Inhibitionskonstante lässt sich danach mit Formel 13 errechnen und ergibt für das Peptid RHRAVL einen K_I -Wert von $K_I = 58 \mu\text{M}$.

$$K'_{M,inh.} = K'_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

$$K_I = \frac{[I] \cdot K'_M}{K'_{M,inh.} - K'_M}$$

Aufgelöst nach K_I :

Formel 13: Berechnung der Inhibitionskonstante K_I des Peptids RHRAVL mit $[I]$ = Konzentration RHRAVL, K'_M = apparente Michaelis-Menten-Konstante der Reaktion ohne Inhibitor, $K'_{M,inh.}$ = apparente Michaelis-Menten-Konstante der Reaktion mit Inhibitor.

5.6.5 Einfluss der Kettenlänge der Liganden auf die Bindungsstärke und Reaktionsgeschwindigkeit

Durch die Mizellbildung aller Peptide während der STD-Titrationsen konnte keine Auskunft über einen Einfluss der Kettenlänge auf die Bindung an die Methyltransferase Set8 erhalten werden.

Aus den Kinetikexperimenten lässt sich jedoch ein Einfluss der Kettenlänge auf die Michaelis-Menten-Konstante erkennen. Von $K'_M = 261 \pm 12 \mu\text{M}$ für das Peptid RHRKVL, über $K'_M = 329 \pm 23 \mu\text{M}$ für das Peptid RHRKVLRD bis zu $K'_M = 523 \pm 250 \mu\text{M}$ für das Peptid AKRHRKVLRD war ein stetiger, wenn auch sehr geringer Anstieg der Michaelis-Menten-Konstante und damit eine geringere Affinität des Substrats zu beobachten. Auch konnte eine eindeutige inhibitorische Wirkung des Peptids RHRAVL nachgewiesen werden. Es konnte zwar ebenfalls keine Dissoziationskonstante mittels einer STD-Titration bestimmt werden, es war aber trotzdem möglich, anhand einer einzigen Reaktion eine Inhibitionskonstante von $K_I = 58 \mu\text{M}$ zu bestimmen.

6 *In-Silico* Modeling und kinetische Charakterisierung der humanen Fucosyltransferase 2 mittels NMR-Spektroskopie

6.1 Fucosyltransferasen

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen, insbesondere Glykosylierungen, spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilität, Lokalisierung und funktionellen Integrität von Proteinen (51). Sie beeinflussen die menschliche Entwicklung, haben aber auch Einfluss auf den Verlauf verschiedener Krankheiten wie zum Beispiel Krebs (52). Glykosylierungsmuster weisen eine enorme Microheterogenität auf und eine Veränderung dieses Musters wurde bei Krebs beobachtet (53). Die Identifizierung von Veränderungen in diesen Mustern kann helfen, Krankheiten früher und besser zu erkennen und die Behandlung zu verbessern. Die Fucosylierung ist eine der häufigsten Glykosylierungen und ist ein wichtiger Baustein bei der Ausbildung der Blutgruppe und spielt eine wichtige Rolle in Signalübertragungen, in Immunreaktionen und bei Entzündungsprozessen (54). Es wurden erhöhte Fucosylierungslevel von glycosilierten Proteinen in Plasma- oder Gewebeproben von Krebspatienten in verschiedenen Studien nachgewiesen, was auf eine Verbindung der erhöhten Expression und Aktivität von Fucosyltransferasen bei Krebs deutet. Die genaue Rolle dieser erhöhten Fucosylierung während einer Krebserkrankung ist jedoch noch unklar (55,56).

Fucosyltransferasen gehören zur Familie der Glycosyltransferasen. Sie katalysieren die Übertragung eines L-Fucosylrestes auf verschiedene Kohlenhydratakzeptoren. Alle 11 humanen Fucosyltransferasen erkennen Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose (GDP-Fucose) als Donorsubstrat und unterscheiden sich in Bezug auf den Kohlenhydratakzeptor und die Position der Verknüpfung (57,58).

Die Fucosyltransferasen I und II (FUT1 und FUT2) katalysieren die Übertragung einer Fucoseeinheit auf die terminale Galactose von *N*-Acetyllactosamin (LacNAc). Die Übertragung findet unter Bildung einer α -1,2-Verknüpfung statt. Die beiden Subtypen FUT1 und FUT2 unterscheiden sich dabei in der Selektivität von Akzeptor Substraten. FUT1 erkennt Oligosaccharide des Typs I mit einem terminales Gal β 1->3GlcNAc Motiv und des Typs II mit einem terminalen Gal β 1->4GlcNAc Motiv. FUT2 akzeptiert Oligosaccharide des Typs I als Akzeptorsubstrate, sowie Oligosaccharide des Typs III, die ein terminales Gal β 1->3GalNAc

Motiv tragen. FUT2 katalysiert die Synthese der Blutgruppen Antigene A, B und H, die auf dem Epithelium und roten Blutkörperchen gefunden werden können. FUT2 wird in Speicheldrüsen, der Luftröhre, der Magen- und Darmschleimhaut, im Nieren- und Blasenepithel sowie im weiblichen Reproduktionstrakt hoch exprimiert. H- und Lewisantigene werden hauptsächlich auf enddermalen Epithelzellen exprimiert, wo auch die Mehrheit von Krebserkrankungen ihren Beginn haben (59,60).

Es gibt immer mehr Beweise, dass fucosylierten Glycanen eine entscheidende Rolle bei Entzündungen und dem Verlauf von Krebserkrankungen zukommt. Die Überexpression bestimmter FUTs und die damit verbundenen erhöhten Level der entsprechenden Glycane kann bei vielen Krebserkrankungen beobachtet werden. Durch Fucosylierung entstehende sLe^x-, sLe^a- und sLe^y-Motive sind typische Epitope für Krebserkrankungen und werden mit der Tumorprogression und Metastasierung in Zusammenhang gebracht (61).

Die Entwicklung von FUT-Inhibitoren bietet deshalb eine potentielle Strategie für neue oder verbesserte Krebstherapien (62). Trotz großer Anstrengungen mögliche FUT-Inhibitoren zu entwickeln, könnte bisher kein Kandidat für klinische Studien gefunden werden. Ein bedeutender Grund für die bisherige Erfolgslosigkeit ist das Fehlen einer Kristallstruktur der FUTs und somit die Möglichkeit geeignete Inhibitoren *in-silico* zu entwickeln (63,64).

6.2 Aufgabenstellung

Die Fucosyltransferase 2 (FUT2) ist an der Bildung verschiedener Oligosaccharide beteiligt. Dazu gehören auch Oligosaccharide mit den Lewismotiven Le^y und sLe^y, welche eine wichtige Rolle im Leukozytenkreislauf und bei der Wechselwirkung von Zellen mit Krankheitserregern spielen. Überexpression von sLe^x, sLe^y und anderen fucosylierten Glykanen wird bei Entzündungen und im Verlauf verschiedener Krebserkrankungen beobachtet. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren keine Strukturdaten für FUT2 bekannt.

Es soll in Zusammenarbeit mit Humaira Zafar (Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi) ein Homologiemodell für FUT2 *in silico* erstellt werden. Dazu sollen verschiedene Enzyme aus der Proteindatenbank mit gleichen Liganden auf Übereinstimmungen mit der Sequenz von FUT2 untersucht werden und aus den besten Kandidaten ein Strukturmodell für FUT2 erstellt werden. Ausgehend von diesem Modell sollen *in silico* Untersuchungen der natürlichen Liganden durchgeführt werden.

Ferner sollen kinetische Parameter der Umsetzung der natürlichen Substrate durch FUT2 mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie und anschließender Progresskurvenanalytik bestimmt werden.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

Fucosyltransferasen gelten als schwierige Ziele in der Forschung. Es gibt nur eine begrenzte Anzahl von Kristallstrukturen und die Übergangszustände sind häufig sehr komplex. Außerdem ist die Bindungsaffinität der Liganden eher gering (68,69). Für FUT2 lag zum Zeitpunkt dieser Arbeit ebenfalls keine Kristallstruktur vor. Deshalb sollte zunächst eine Modellstruktur aus möglichst ähnlichen Proteinen mit den gleichen Liganden erstellt werden.

6.3.1 Erstellung eines Modells der FUT2 Struktur

Die PDB Datenbank wurde mit dem BLAST-Werkzeug nach Proteinen mit Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz zu der von FUT2 durchsucht. Diese Suche lieferte keine Ergebnisse, die eine Ähnlichkeit mit einem größeren *E*-Wert als der gesetzten Mindestgrenze aufwiesen. Deshalb wurde die Suche auf Proteine eingegrenzt, die die gleichen Liganden binden. Es konnten sechs Proteine gefunden werden, die den Akzeptorliganden *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) binden, und fünf Proteine, die den Donorliganden GDP-Fucose binden. Für jedes dieser Proteine wurde erneut mit BLAST ein individueller Sequenzabgleich durchgeführt. Keiner dieser Abgleiche zeigte eine Übereinstimmung in der Sequenz mit der Sequenz von FUT2 von mehr als 50%.

Tabelle 2: Beste BLAST Ergebnisse des Vergleichs von FUT2 mit LacNAc bindenden Proteinen.

LacNAc bindendes Protein	Maximum Score	Total Score	Query Cover	E-Value	Identity
1W3F	18.9	33.1	17%	0.16	27%
1ZI3	21.6	21.6	22%	0.031	26%
2VS3	21.9	50.8	35%	0.024	22%

Die Ergebnisse wurden deshalb genauer auf die Aminosäuren untersucht, die an der Bindung der entsprechenden Liganden beteiligt sind. Es wurden alle *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) bindende Proteine aus der Proteindatenbank (PDB) herausgesucht und ihre Aminosäuresequenz mit der von FUT2 verglichen. Hierbei wurde nach der größten Übereinstimmung zwischen dem Teil der Sequenz des LacNAc bindenden Proteins, der für die Ligandenbindung verantwortlich ist, und dem Teil der FUT2-Sequenz, der wahrscheinlich für die Ausbildung der Bindungstaschen verantwortlich ist, gesucht. Die größte Übereinstimmung ergab sich mit der Sequenz des hämolytischen Lectins aus *Laetiporus sulphureus* (LSLa; PDB-Eintrag: 1W3F (70)).

```

FUT2 77 GEYATLYAL-AKMNGRPAFI--PAQMH-----STLAPIFRITLP 112
      GE+A LYA+ +K G+ F PA+ + + L+ FR+ P
LSLa 55 GEHAGLYAIKSKATGKVLFSRRPAEPYVGQIDGDGRYPDDNWFKIEPGKTYLSKYFRLVQP 114

FUT2 113 VLHSATASRIPWQNYHLN 130
      +A SR Q Y N
LSLa 115 STGTALVSRTHLQPYFWN 132

```

Abbildung 27: Vergleich der Sequenz von FUT2 mit der Sequenz des hämolytischen Lectins LSLa: Die Region beinhaltet die Aminosäuren (R123, W131) in LSLa, die an der Bindung von LacNAc beteiligt sind. Es gibt 31 positive Übereinstimmungen aus 78 Positionen (39%), von denen 21 identische Aminosäuren sind (27%) und 24 Lücken (30%).

Die gleiche Methode wurde bei der Suche nach einem Kandidaten für die Donorseite des FUT2 Modells angewandt. Es wurden alle Strukturen von Proteinen, die GDP-Fucose binden, aus der PDB herausgesucht und ihre Aminosäuresequenz mit der Sequenz von FUT2 verglichen. Es wurde sich wieder auf den Teil, der für die Bindung des Liganden verantwortlich ist, konzentriert. Die Struktur der GDP-Fucose Protein *O*-Fucosyltransferase 1 (POFUT1) im Komplex mit GDP-Fucose aus *Caenorhabditis elegans* (PDB-Eintrag: 3ZY5 (71)) zeigte hierbei die größte Übereinstimmung.

Tabelle 3: Beste Ergebnisse des BLAST-Abgleichs der Sequenz von FUT2 mit GDP-Fucose bindenden Proteinen aus der PDB.

GDP-Fucose bindendes Protein	Maximum Score	Total Score	Query Cover	E-Value	Identity
1DB3	17.3	77.7	21%	0.67	50%
3SIX	20.4	36.6	13%	0.056	44%
3ZY5	25.0	98.9	42%	0.003	34%
4AP6	23.9	71.2	21%	0.006	27%

```

FUT2 174 VREEAQKFLRGLQVNGSRPGTFVGVHVR--GDYVHV 208
      + E+A+KF + N ++P FV VH+R D+V V
POFUT1 218 ITEQAKKF---ISANLAKP--FVAVHLRNDADWVRV 248

```

Abbildung 28: Vergleich der Sequenz von FUT2 mit der Sequenz der GDP-Fucose Protein *O*-Fucosyltransferase 1 (POFUT1): Die Region beinhaltet die Aminosäuren in POFUT1, die an der Bindung von GDP-Fucose beteiligt sind. Es gibt 22 positive Übereinstimmungen aus 36 Positionen (61%), von denen 14 identische Aminosäuren (39%) und sechs Lücken (16%) sind.

Die Kristallstrukturdaten der beiden Kandidaten wurden aus der PDB heruntergeladen. In der Kristallstruktur des hämolytischen Lectins LSLa (PDB-ID: 1W3F) wurden die Aminosäuren

115-150, die für die Bildung der Bindungstasche und Bindung des Ligands verantwortlich sind, durch die Aminosäuren 113-148 aus der Sequenz von FUT2 ausgetauscht, die vermutlich die gleiche Aufgabe übernehmen. Die Aminosäuren 151-314 der mutierten LSLa Struktur wurden entfernt. Diese Aminosäuren spielen für die Ausbildung der Bindungstasche keine Rolle und befinden sich auch nicht in unmittelbarer räumlicher Nähe der Bindungstasche. Wassermoleküle konnten zur Vereinfachung der Modellierung ebenfalls entfernt werden, da diese nicht an der Bindung beteiligt sind. Die so bearbeitete Kristallstruktur wurde danach mit dem Protein Preparation Prepwizard 10.4 vorprozessiert, optimiert und minimiert (72-74).

Die Struktur der GDP-Fucose Protein *O*-Fucosyltransferase 1 (PDB-ID: 3ZY5) wurde ähnlich bearbeitet. Die bindungsrelevanten Aminosäuren 218-248 wurden durch die Aminosäuren 174-208 der FUT2 ersetzt. Die Aminosäuren 1-213 wurden entfernt. Wassermoleküle konnten hier ebenfalls entfernt werden und die Struktur wurde auf gleiche Weise optimiert wie bereits die Struktur für die Akzeptorbindung.

Die native Struktur von LSLa im Komplex mit dem Donorsubstrat LacNAc zeigt Wasserstoffbrückenbindungen des Liganden mit Arg123, Trp131, Asp141 und Gln142 (siehe Abbildung 29). Diese Interaktionen ähneln denen in der mutierten Struktur, in der ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen mit Arg123 aufgebaut werden (siehe Abbildung 30). Auch eine weitere Wasserstoffbrückenbindung mit Asp133 weist Ähnlichkeiten zur nativen Struktur auf.

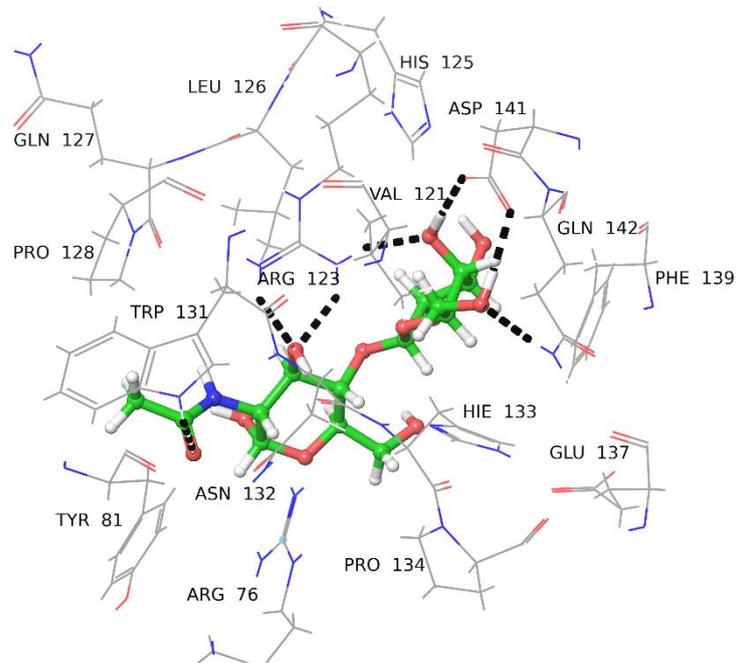


Abbildung 29: Interaktionen des Donorsubstrats LacNAc mit dem nativen hämolytischen Lectin LSLa (PDB-ID: 1W3F). Wasserstoffbrückenbindungen sind durch schwarze, gestrichelte Linien dargestellt. Arg123, sowie Asp141, TRp131 und Gln142 sind an der Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt.

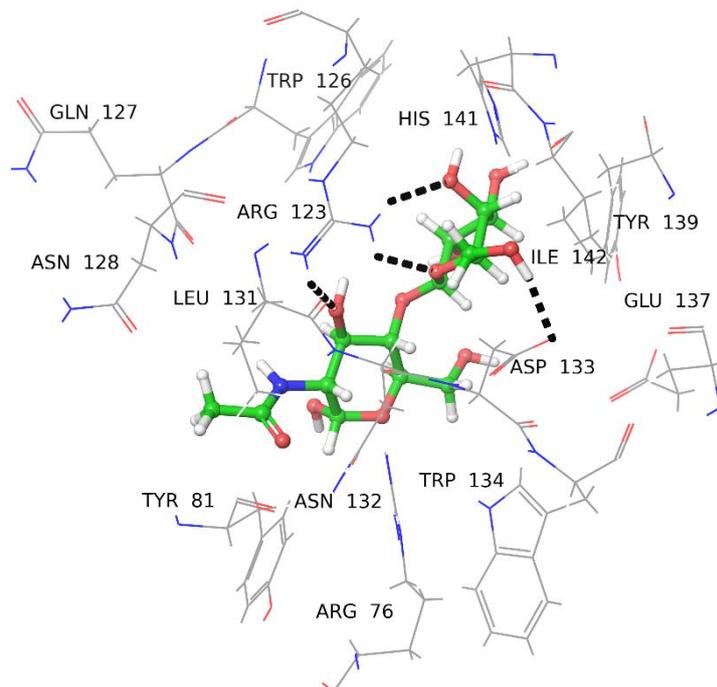


Abbildung 30: Interaktionen des Donorsubstrats LacNAc mit der auf der Grundlage des hämolytischen Lectin erstellten Struktur. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch schwarze, gestrichelte Linien dargestellt. Arg123, sowie Asp133 sind an der Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt.

Der POFUT1 Wildtyp bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit GDP-Fucose über Gly42, Asn43, His238, Arg240, Asp334, Ser355 und Thr356 aus (siehe Abbildung 31). Alle Wasserstoffbrückenbindungen außer mit Gly42 und Asn43 wurden nach der Mutation beibehalten. Zusätzlich konnte eine neue positive Interaktion, eine π - π -Wechselwirkung mit dem aromatischen Rest von Phe357 beobachtet werden (siehe Abbildung 32).

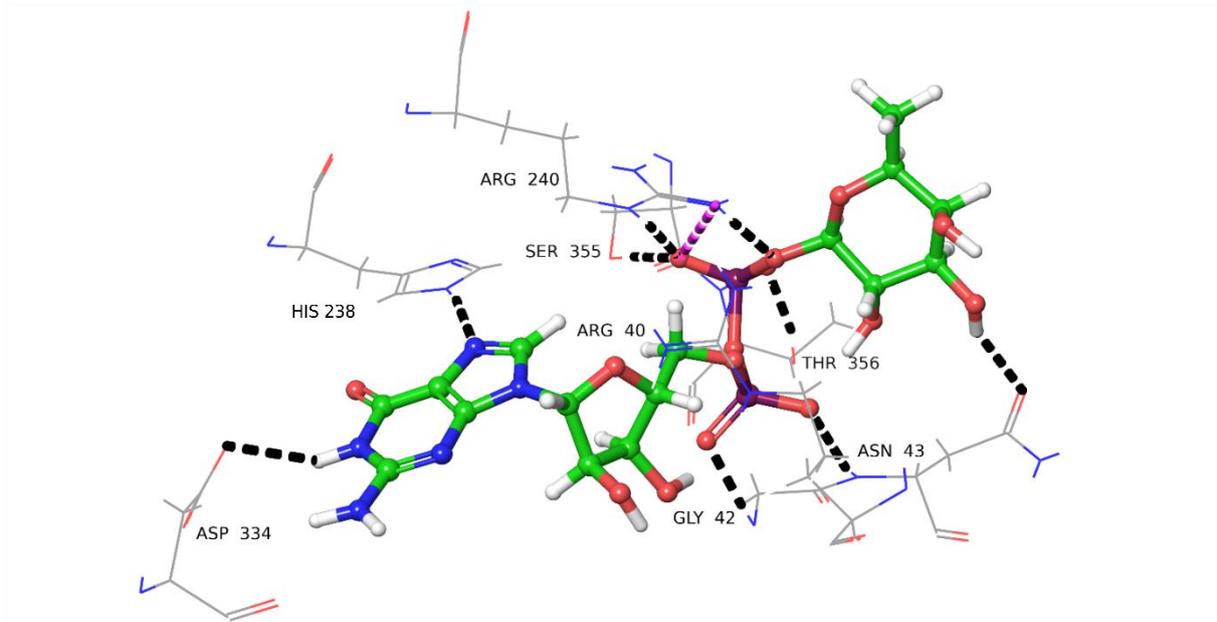


Abbildung 31: GDP-Fucose zeigt mehrere Wasserstoffbrückenbindungen (schwarze, gestrichelte Linien) im Komplex mit der nativen Form von POFUT1. So sind Interaktionen mit Arg240, Ser355, His238, Asp334, Asn43 und Gly42 zu beobachten.

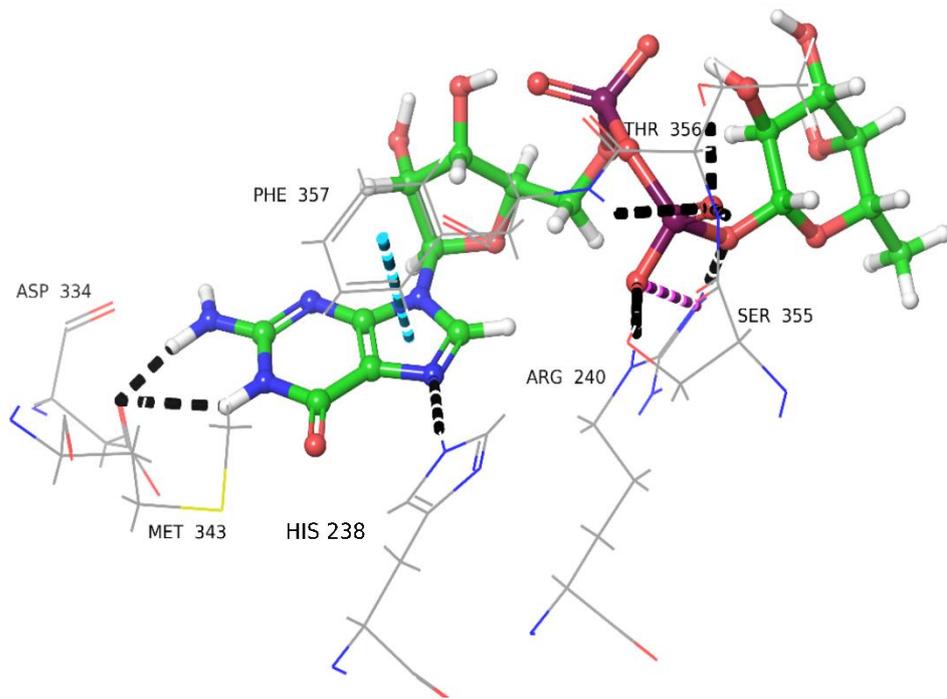
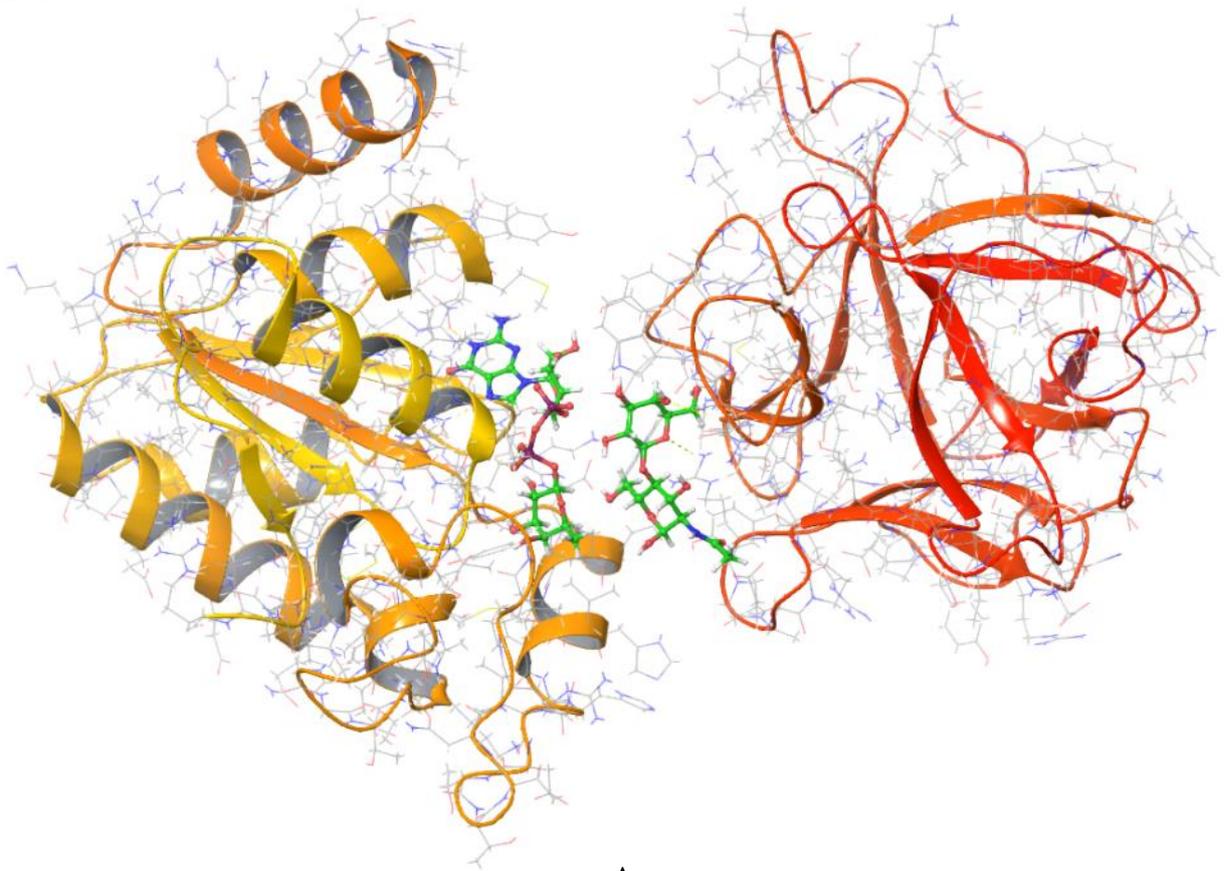
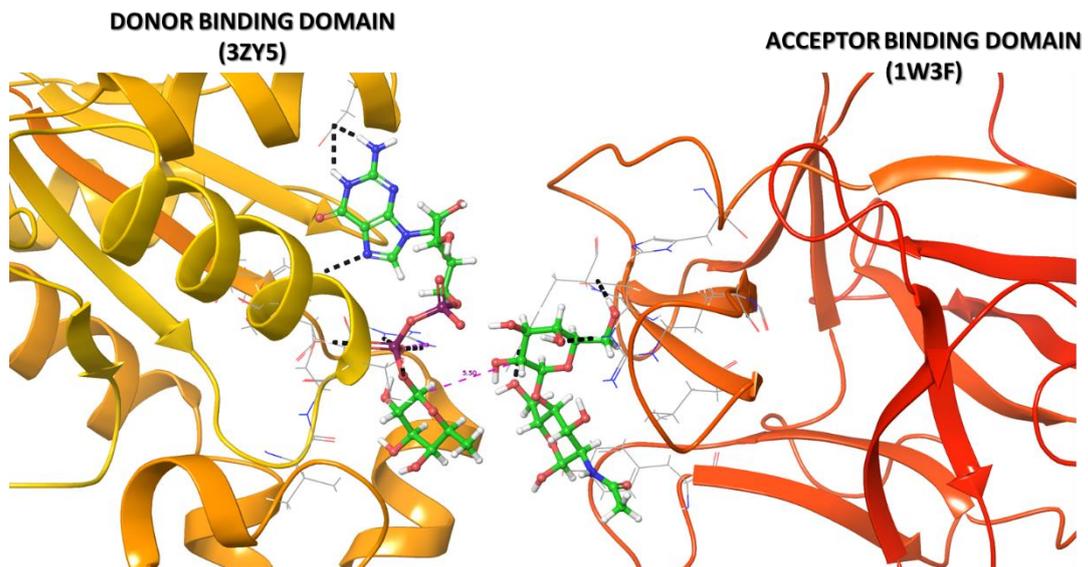


Abbildung 32: GDP-Fucose zeigt ebenfalls mehrere Wasserstoffbrückenbindungen (schwarze, gestrichelte Linien) im Komplex mit der modifizierten Form von POFUT1. So sind Interaktionen mit Arg240, Ser355, His238 und Asp334 zu beobachten. Ferner wurde eine neue π - π -Interaktion mit Phe357 beobachtet.

Die Modelle der mutierten Proteine im Komplex mit ihren jeweiligen Substraten wurden so angeordnet, dass die 2-OH-Gruppe der Galactose und das C-1 der Fucose 4.5 Å voneinander entfernt waren (1Abbildung 35). Diese Distanz wurde gewählt, weil sie für einen nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe optimal ist und es so zur Bildung der glycosidischen Bindung führen kann. Um diese Positionen erreichen zu können, mussten einige Modifikationen vorgenommen werden. Zwei nicht an der Bindung beteiligte Aminosäurereste, Trp126 des modifizierten LSLa's und Tyr337 der modifizierten POFUT1, wurden so gedreht, dass eine Annäherung der beiden Proteine auf 3-5 Å möglich wurde. Außerdem wurden die Fucose- und Phosphateinheiten etwas gedreht, so dass das anomere Zentrum der Fucoseinheit besser für einen nukleophilen Angriff zugänglich ist.



A



B

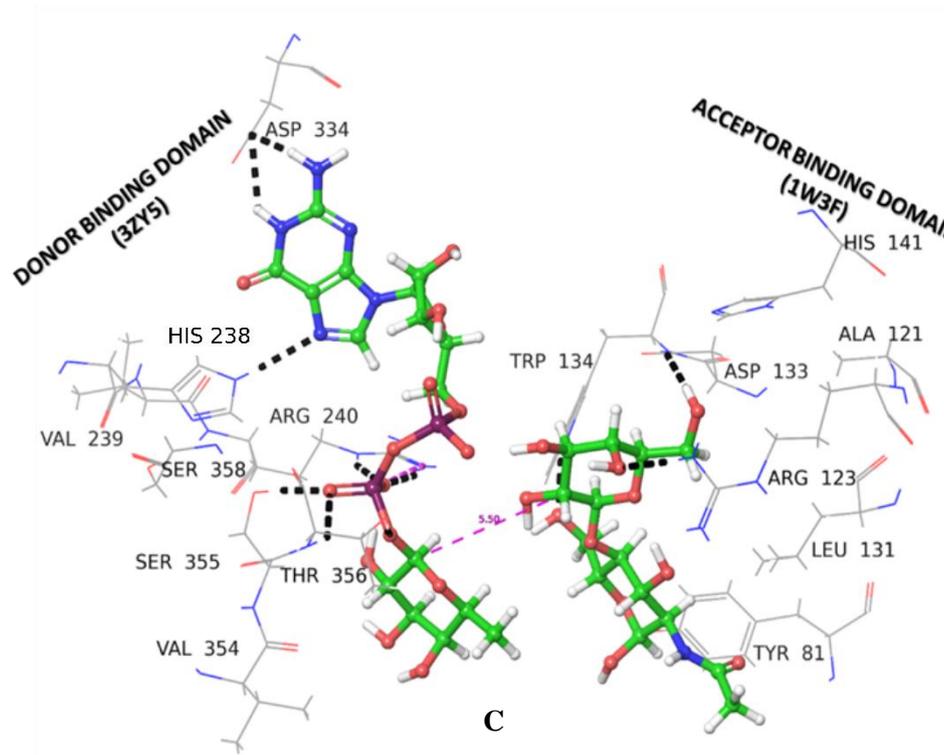


Abbildung 33: Darstellung des Protein-Ligand-Komplexes mit der modifizierten POFUT1 Domäne (links) und modifizierten LSLa Domäne (rechts) sowie den beiden entsprechenden Liganden GDP-Fucose (links) und LacNAc (rechts). A: Großansicht des Komplexes als mit unterlegtem Schlaufenmodell mit gezeigten Resten der beteiligten Aminosäuren. B: Ausschnitt des Komplexes als Schlaufenmodell mit Interaktionen zwischen Aminosäureseitenketten und Liganden. C: Ausschnitt der Bindungstasche mit den Liganden und Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten. Der Abstand zwischen dem anomeren Kohlenstoff der Fucose und der 2-OH-Gruppe der Galactose beträgt 4.5 Å.

6.3.2 Energieminimierung des Protein-Ligand-Komplexes

Der Protein-Ligand-Komplex besteht sowohl aus dem gelösten Protein und Ligand sowie aus dem Lösungsmittel (Wasser und Pufferionen). Um die Stabilität der beiden im vorherigen Abschnitt beschriebenen Protein-Ligand-Komplexe zu bestimmen, wurden die Komplexe mit Hilfe des *MacroModel* Moduls der Schrödinger Software minimiert und ihre Bindungsenergie ΔG_{bind} mit Hilfe der Software vorhergesagt. Die Bindungsenergie ergibt sich aus der Energie des Komplexes und der Energien der freien Moleküle nach Formel 14:

$$\Delta G_{\text{bind}} = E_{\text{complex}} - E_{\text{ligand}} - E_{\text{receptor}}$$

Formel 14: Mit ΔG_{bind} = Bindungsenergie des freien Liganden, E_{complex} = Energie des Protein-Ligand-Komplexes, E_{ligand} = Energie des freien Liganden und E_{receptor} = Energie des freien Proteins.

Die Bindungsenergien für LacNAc und GDP-Fucose mit den mutierten Proteinen waren größer als die Bindungsenergien der Liganden mit den entsprechenden natürlichen Proteinen, was auf eine etwas schwächere Bindung hindeutet. Die Werte sind allerdings alle immer noch deutlich negativ (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Bindungsenergien von LacNAc und GDP-Fucose in natürlichen und *in silico* gemodelten Komplexen mit mutierter POFUT1 und mutierter LSLa.

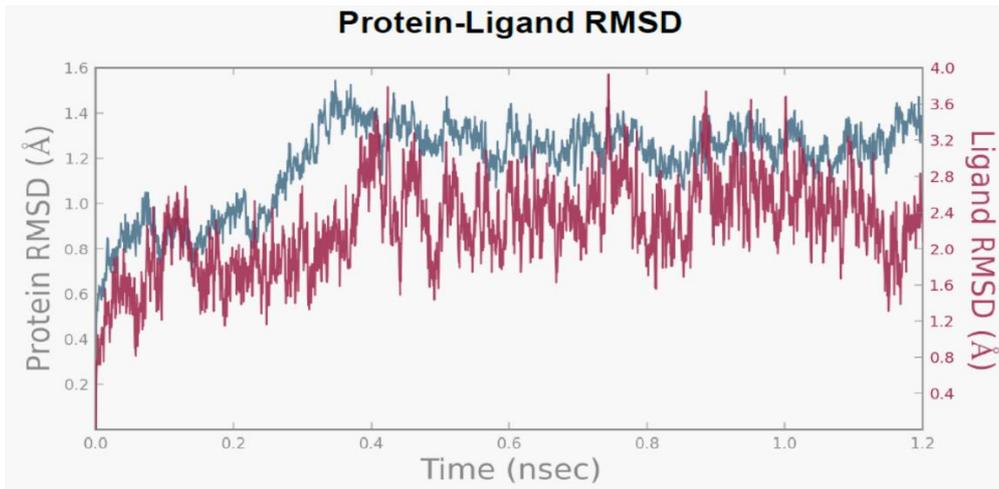
Rezeptor	Ligand	ΔG_{bind} (kcal/mol)	E_{Complex} (kcal/mol)	E_{Receptor} (kcal/mol)	$E_{\text{Ligand(s)}}$ (kcal/mol)
LSLa (PDB-ID: 1W3F)	LacNAc	-53.1	-14861.7	-14790.9	-17.7
POFUT1 (PDB-ID: 3ZY5)	GDP-Fuc	-108.6	-18317.5	-18050.2	-158.7
LSLa (mutiert)	LacNAc	-21.5	-7109.4	-7070.9	-17.0
POFUT1 (mutiert)	GDP-Fuc	-70.9	-9268.4	-9035.3	-162.2
Protein Komplex (mutiert)	LacNAc und GDP-Fuc	-87.3	-16272.4	-16003.6	-181.5
Protein Komplex (mutiert)	GDP-Fuc	-62.5	-16234.4	-16009.4	-162.5
Protein Komplex (mutiert)	LacNAc	-16.0	-16058.3	-16023.3	-19.0

Mit dem erstellten Model bestehend aus den beiden mutierten Proteinen und den beiden Liganden wurden Molecular Dynamics Simulationen durchgeführt. Die MD-Simulationen werden mit dem Desmond Molecular Dynamics System, welche im Maestro-Desmond Interoperability Tools (Schrödinger, New York, NY, Version 2.2 2009) enthalten ist, durchgeführt. Dazu wurde der Komplex in eine Wasserbox mit 200 mM NaCl eingebettet. Nachdem die Wasserbox ebenfalls einer Minimierung unterzogen wurde, wurde eine MD-Simulation über 1.2 ns bei 310 K und 10913 hPa durchgeführt. Dabei wird in 0.1 ps Abständen die Energie aufgezeichnet und in 0.5 ps Abständen die Trajektorie. Es wird ein OPLS_2005 Kraftfeld eingesetzt und das SPC Modell für Wasser angewandt. Elektrostatische Interaktionen werden mit dem Particle mesh Ewald (65) und einer maximalen Distanz von 9.0 Å berechnet.

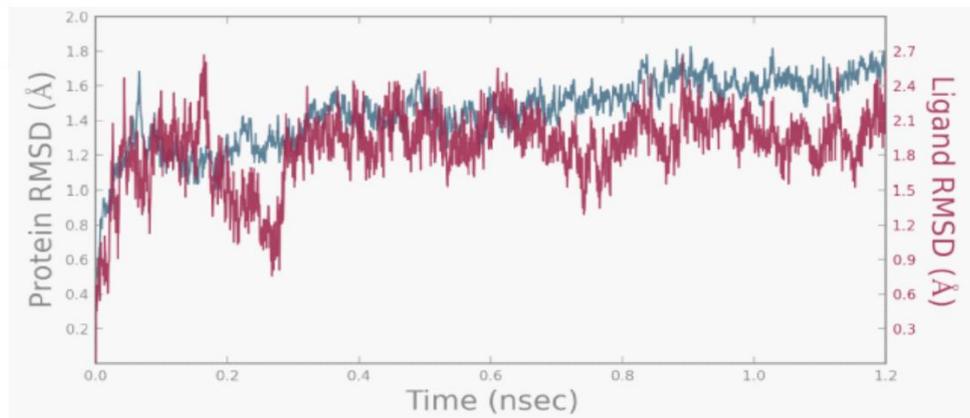
Des Weiteren wird ein Nose-Hoover-Chain Thermostat (66) mit einer Relaxationszeit von 1.0 ps und ein isotropisches Martyna-Tobias-Klein Barometer (67) mit einer Relaxationszeit von 2.0 ps eingesetzt. Integrationszeitschritte werden auf 2.0 fs festgelegt. Die Datenanalyse erfolgt mit Hilfe von Desmond Simulation Event Analysis (Schrödinger, LLC, 2011).

Die Positionen der beiden Liganden waren über die gesamte Dauer der Simulation konstant und sie verweilten in den entsprechenden Proteintaschen. Außerdem blieb die Entfernung zwischen den Schlüsselaminosäuren und den entsprechenden Wasserstoffen der GDP-Fucose konstant, so dass eine ausreichende Stabilität des Komplexes angenommen werden kann (siehe Abbildung 34).

Die genaue Entfernung zwischen den Schlüsselaminosäuren und den Liganden wurde mit dem Simulations Event Analysis Tool des Maestro Plugins der Schrödinger Software ausgelesen. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen LacNAc und Arg123 und Asp133 könnten für über 80% der Simulationszeit beobachtet werden (siehe Tabelle 5). Für GDP-Fucose konnten konstante Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp334, His238 und Arg240 beobachtet werden. Eine weitere häufig auftretende π - π -Interaktion mit Phe357 (50% der Simulationszeit) konnte ebenfalls beobachtet werden. Alle beobachteten Interaktionen sind in 1Abbildung 35 dargestellt.



A

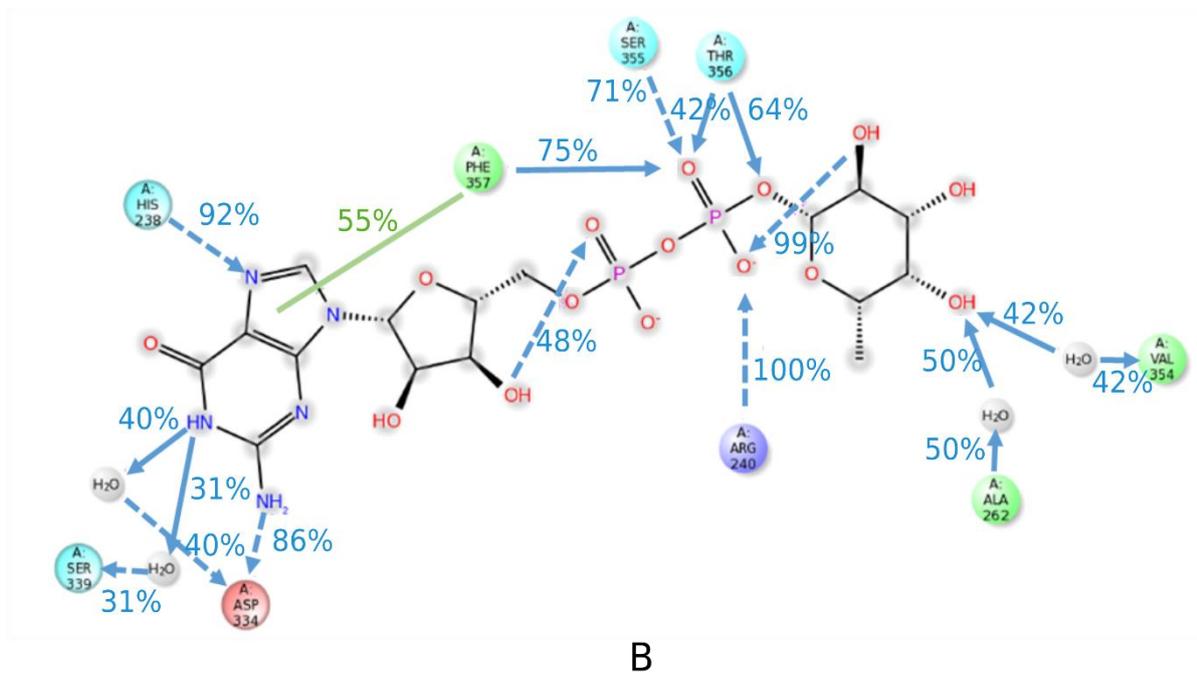
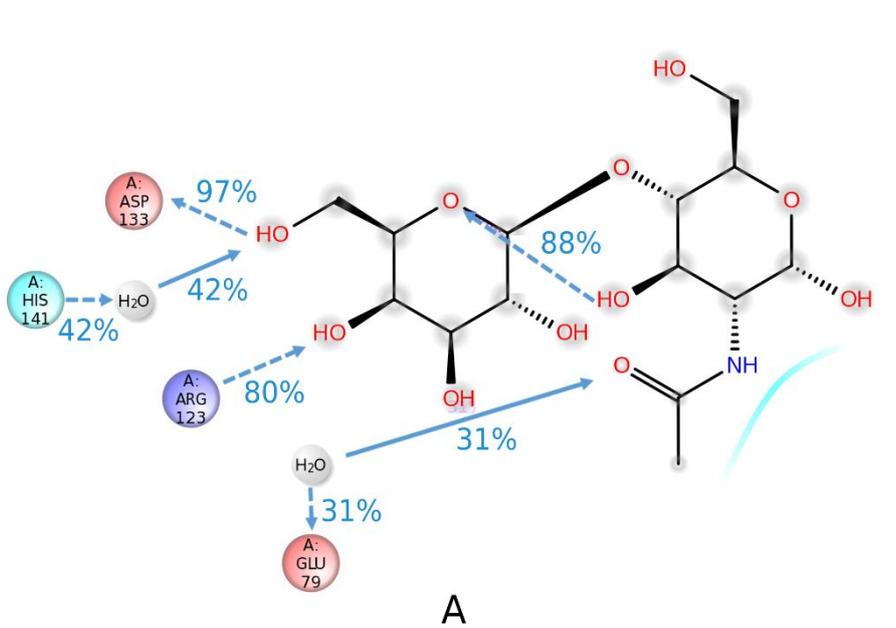


B

Abbildung 34: Simulation des Protein-Ligand-Komplexes bestehend aus beiden mutierten Proteinen und den beiden Liganden. A zeigt den RMSD-Verlauf für mutiertes LSLa und B für mutiertes POFUT1. Die blaue Linie zeigt jeweils den Verlauf für die C α -Komponenten des jeweiligen Proteins und die Linie in Magenta zeigt den Verlauf für den Liganden. Alle Daten stammen aus der gleichen Simulation.

Tabelle 5: Interaktionen zwischen Protein und Liganden im erstellten Model für FUT2. Die Aminosäuren entsprechen denen aus den mutierten Proteinen LSLa (LacNAc-Bindung) und POFUT1 (GDP-Fucose-Bindung). Aufgeführt sind einzelne Wasserstoffbrückenbindungen (H-Bindung) und π - π -Interaktionen sowie die durchschnittliche Distanz der Bindungspartner und der Anteil der Zeit, in der die entsprechende Interaktion während der MD-Simulation beobachtet werden konnte.

Aminosäuren und interagierender Rest		Ligand und interagierender Rest		Art der Interaktion	Durchschnittliche Entfernung [Å]	Anteil Datenpunkte mit Distanz < 3.6 Å
Asp133	CO	LacNAc	OH	H-Bindung	1.9 ± 1.3	97%
Arg123	NH ₂	LacNAc	O	H-Bindung	2.1 ± 0.4	80%
Asp334	O	GDP-Fuc	NH ₂	H-Bindung	2.0 ± 0.3	86%
His238	H	GDP-Fuc	N	H-Bindung	2.0 ± 0.2	92%
Phe357	Aromat	GDP-Fuc	Purinring	π - π Interaktion	3.7 ± 0.3	55%
Arg240	N	GDP-Fuc	P-O	H-Bindung	2.0 ± 0.3	100%



- H-bond (backbone)
- - - H-bond (sidechain)
- π - π -Interaction

1Abbildung 35: Protein-Ligand-Interaktionen für A LacNAc und B GDP-Fucose mit dem Modellprotein von FUT2. Blaue durchgezogenen Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Aminosäurerückgrat, blaue gestrichelte Linien für Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäuren Seitenketten oder innerhalb der Liganden und grüne Linien für π - π -Interaktionen.

6.3.3 Charakterisierung der kinetischen Eigenschaften von FUT2 mittels NMR-Spektroskopie und Progresskurvenanalytik

Der Transfer der Fucoseeinheit aus GDP-Fucose durch eine Fucosyltransferase hat GDP als Nebenprodukt, welches ein natürlicher Inhibitor der Fucosyltransferasen ist. Um diese Inhibition auszuschließen, kann GDP durch die Zugabe eines weiteren Enzyms, einer Phosphatase, abgebaut werden. Dabei wird GDP in Guanidinmonophosphat (GMP) abgebaut, welches keine inhibierende Wirkung hat.

Die NMR-Messungen wurden mit einer Lösung von 1 μM FUT2, 750 μM GDP-Fucose und 250 μM *N*-acetyl-3-*O*- β -D-galactopyransoyl- β -D-galactosamin-methylglycosid in D_2O (pH = 7.0) mit 12.5 mM Tris-*d11* und 75 mM NaCl als Puffersubstanzen durchgeführt. Die Konzentration des Akzeptors wurde anhand bereits bekannter K_M -Werte gewählt (75). Ferner wurden 10 *Units* alkalische Phosphatase zugegeben. Alle Messungen wurden an einem Bruker Avance I 700 MHz NMR-Spektrometer bei 310 K durchgeführt. Für jeden Datenpunkt wurde ein ^1H -Spektrum mit Wasserunterdrückung (*excitation sculpting*) und 64 Scans aufgenommen. Es wurde zuerst ein Spektrum ohne den Donor GDP-Fucose aufgenommen. Nach Zugabe des Donors wurden bis zum Abschluss der enzymatischen Umsetzung nach 16.5 h im Abstand von 300 s Spektren aufgenommen.

Alle Spektren wurden vor der Fouriertransformation mit einer exponentiellen Gewichtungsfunktion (lb 0.30 Hz) multipliziert und über die seriellen Funktionen der TopSpin Software prozessiert und integriert. Zur Auswertung wurden die isolierten Integrale des Donors GDP-Fucose (H-8, H-1' und H-6') sowie die isolierten Integrale des Akzeptors *N*-Acetyl-3-*O*- β -D-galactopyransoyl- β -D-galactosamin-methylglycosid (NAc, H-1, OMe) eingesetzt. Zur genauen Bestimmung der Konzentrationen wurden die Integrale der H-1'-Signale der GDP-Fucose herangezogen.

Die so erhaltene Konzentration-Zeit-Kurve wurde mit Hilfe des Programms MatLab unter Anwendung der Lambert W-Lösung für die Michaelis-Menten-Kinetik ausgewertet (76). Dieses Verfahren erlaubt die Bestimmung von K_M' und v_{max}' aus der Verfolgung einer einzigen Reaktion (50,77).

Abbildung 36 zeigt ausgewählte Bereiche einiger Spektren über einen Zeitraum von 16.5 h. Es kann eine Abnahme der Signalintensitäten der Substrate klar erkannt werden. Ebenso lässt sich der Aufbau der Produkte anhand der entsprechenden Signalintensitäten verfolgen. In der

Region von 2.0-2.2 ppm lässt sich anhand der Signale der NAc-Gruppen des Substrats (2.06 ppm) und des Produkts (2.10 ppm) die Reaktion verfolgen. Gleiches gilt für die Signale der OMe-Gruppe in der Region 3.4-3.5 ppm, das Signal des H-1s der Fucosegruppe des Produkts (5.24 ppm), die Signale der H-1` des Guanosins (5.92 ppm) und des H-1` der GDP-Fucose (5.94 ppm), sowie das Signal des H-8 der GDP-Fucose (8.11 ppm).

Mehrere dieser Signale sind gut geeignet, um die Substratkonzentrationen über den Verlauf der Reaktion zu bestimmen. Für die Bestimmung der Werte K_M' und v_{max}' wurden die Integrale der NAc-Gruppe des Akzeptors in Konzentrationen umgerechnet und der Konzentration-Zeit-Verlauf in MatLab mit der exponentiellen Kurvenanpassung, welche die Lösung der Michaelis-Menten-Gleichung mit der Lambert W-Funktion nutzt, ausgewertet (siehe Abbildung 37). Es wurde ein $K_M'_{Akzeptor} = 613 \pm 121 \mu\text{M}$ und ein $v_{max}' = 1.7 \pm 0.4 \text{ nM/s}$ erhalten. Der K_M' -Wert für den Akzeptor liegt im Bereich eines in der Literatur beschriebenen K_M -Wertes von $K_M = 1.4 \text{ mM}$ für ein radioaktiv markiertes α 1-3-verknüpftes Oligosaccharid, welcher mit Flüssigszintillationsspektrometrie ermittelt wurde (75).

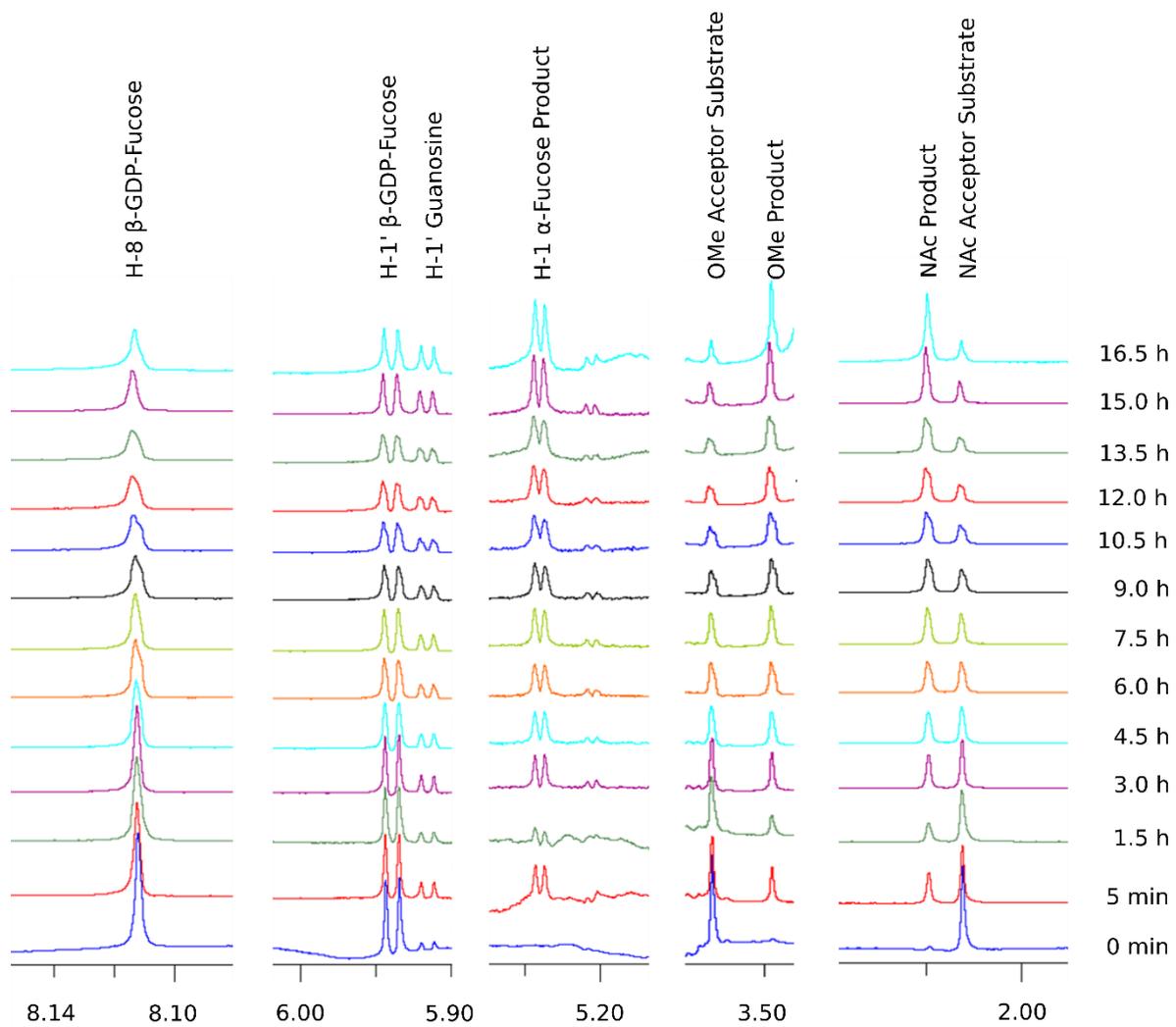


Abbildung 36: Ausgewählte ^1H -Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten der enzymatischen Umsetzung durch FUT2 von GDP-Fucose und *N*-Acetyl-3-*O*- β -D-galactopyransoyl- β -D-galactosamin-methylglycosid. Das Signal bei 8.11 ppm zeigt den Abbau von GDP-Fucose anhand des H-8-Signals der GDP-Fucose ebenso wie das H-1' (5.94 ppm). Ebenso lässt sich ein Abbau des *N*-Acetyl-3-*O*- β -D-galactopyransoyl- β -D-galactosamin-methylglycosid anhand der Signale der OMe- (3.53 ppm) und NAc-Gruppe (2.03 ppm) verfolgen. Im gleichen Maße lässt sich der Aufbau der der Produkte anhand des H-1' des Guanosins (5.92 ppm) und der Signale des fucosylierten Produkts (H-1, 5.24 ppm; OMe, 3.50 ppm; NAc 2.05 ppm) verfolgen.

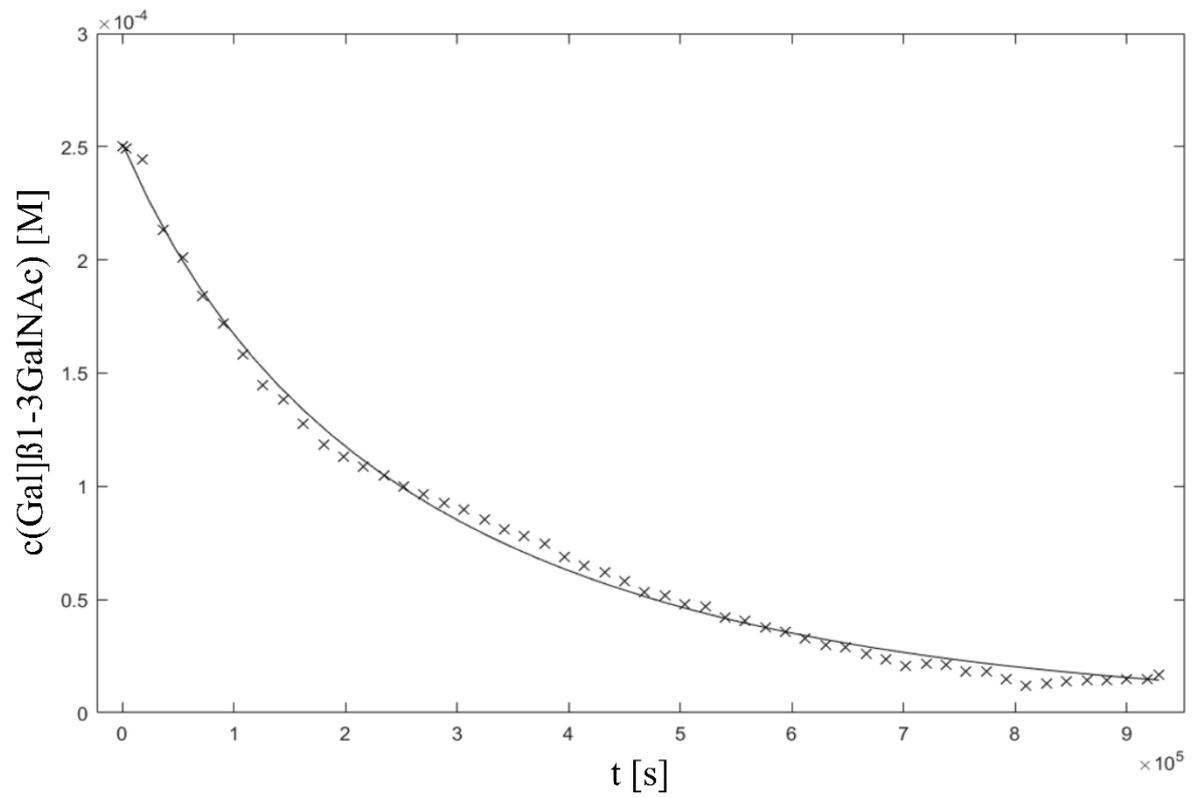


Abbildung 37: Konzentration-Zeit-Verlauf des Substrats N-Acetyl-3-O-β-D-galactopyransoyl-β-D-galactosamin-methylglycosid. Gezeigt als schwarze Linie ist die exponentielle Kurvenanpassung mit der Lösung der Michaelis-Menten-Gleichung unter Einsatz der Lambert W-Funkt. Aus der Anpassung ergibt sich $KM'_{\text{Akzeptor}} = 613 \pm 121 \mu\text{M}$ und $v_{\text{max}} = 1.7 \pm 0.4 \text{ nM/s}$.

7 Charakterisierung der enzymatischen Sialylierung durch humane β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1 (ST6Gal I)

7.1 Sialyltransferasen

Die Biosynthese von sialinsäurehaltigen Glykanen wird durch verschiedene Sialyltransferasen (EC 2.4.99.X) katalysiert. Diese Sialyltransferasen werden anhand der von ihnen katalysierten Verknüpfung in vier Gruppen eingeteilt. Dies sind die Verknüpfungen ST3Gal (2,3-verknüpfte Neuraminsäure an Galaktose), ST6Gal (2,6-verknüpfte Neuraminsäure an Galaktose), ST6GalNAc (2,6-verknüpfte Neuraminsäure an *N*-Acetyl-galaktosamin) und ST8Sia (2,8-verknüpfte Neuraminsäure an eine weitere Neuraminsäure) (78). Alle Säugetiere verfügen über Sialyltransferasen, die sich in 20 Untergruppen einteilen lassen und evolutionär über alle Spezies hochkonserviert sind (79). Sialyltransferasen katalysieren die Übertragung eines Neuraminsäurerests von einem aktivierten Zuckernukleotiddonor, Cytidin-5'-monophosphat-Neuraminsäure (CMP-Sia), auf verschiedene Akzeptorsubstrate. Mögliche Akzeptorsubstrate sind Glykane mit terminalen Galaktosen (Gal), *N*-Acetylgalaktosaminen (GalNAc) oder Sialinsäuren (Sia) (80). Gensequenzanalysen zeigten, dass es sich bei Sialyltransferasen um Typ II Transmembranproteine handelt, die nur in den trans-Zisternen des Golgi-Apparats gefunden werden. Die meisten Informationen über die Funktion und Bedeutung der Sialyltransferasen wurden aus Knock-Out-Studien mit Mäusen erhalten, da es noch keine effektiven, sowie selektiven und zellgängigen Inhibitoren gibt (81).

Es konnte gezeigt werden, dass neuraminsäurehaltige Glykane an verschiedenen molekularen Interaktionen wie Zell-Zell-Adhäsion, Rezeptor-Ligand-Interaktionen, Befruchtung, Blutgerinnung sowie Immunreaktionen beteiligt sind (82). Außerdem konnte eine Beteiligung bei Entzündungen und viralen Infektionen bewiesen werden (83). Aktuelle Forschungen konnten weitere Erkenntnisse zu Verbindungen von Sialyltransferasen mit verschiedenen Krankheiten liefern und unterstreichen das Potential von Sialyltransferasen als Ziele für Therapeutika (84). Hypersialylierung von β 1-Integrin fördert die Zellwanderung und Metastasierung bei verschiedenen Zellarten, wie Darm-, Lungen- und Eierstockkrebs. Die Überexpression von Sialyltransferasen, besonders von ST6Gal I, ST3Gal I, ST3Gal III, ST3Gal IV, ST6GalNAc I und ST6GalNAc V, korreliert stark mit der Tumordinvasivität und bietet Tumorzellen einen erhöhten Schutz vor Apoptose (85). Eine erhöhte Sialylierung erhöht

außerdem die Widerstandsfähigkeit von Tumoren gegenüber Radiotherapien (86). Durch die erhöhte Expression von Sialyltransferasen während eines bösartigen Tumorwachstums lassen sich ungewöhnliche Sialylierungsmuster auf den Tumorzellen beobachten (87). Eine Inhibierung von überexpressierten Sialyltransferasen stellt deshalb einen möglichen Ansatz für eine Verbesserung von Krebstherapien dar. Erkenntnisse zu den kinetischen Parametern von ST6Gal I liegen bisher nur begrenzt vor (vergleiche Tabelle 6).

Tabelle 6: Kinetische Parameter von ST6Gal I in verschiedenen Spezies.

Spezies	Substrat	K_M [mM]	v_{max} [nM/s]
Rattus norvegicus	N-Acetyllactosamin	1.62 (88)	-
		1.67 (89)	-
Recombinant homo sapiens	N-Acetyllactosamin	2.3 (90)	-
Bos taurus	N-Acetyllactosamin	12 (91)	80
Recombinant homo sapiens	CMP-NeuAc	0.15 (90)	-
Rattus norvegicus	CMP-NeuAc	0.158 (90)	-

7.2 Aufgabenstellung

Neuraminsäurehaltige Glykane sind an verschiedenen molekularen Interaktionen wie Zell-Zell-Adhäsion, Befruchtung, Blutgerinnung sowie Immunreaktionen beteiligt. Sialyltransferasen katalysieren beim Aufbau der komplexen Glakane die Übertragung des Sialylrestes von Cytidin-5'-monophosphat-Neuraminsäure auf einen Kohlenhydratakzeptor. ST6Gal I katalysiert eine Verknüpfung des Sialylrestes an die 6-OH-Gruppe einer endständigen Galaktose.

In Zusammenarbeit mit Muniza Shaikh (Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi) soll ausgehend von einer bereits publizierten Kristallstruktur von ST6Gal I eine *in silico* Untersuchung der Bindung der natürlichen Substrate von ST6Gal I durchgeführt werden. Die Ergebnisse der *in silico* Untersuchung sollen durch STD-NMR-Experimente verifiziert und ein Bindungsepitop für das Donorsubstrat erstellt werden.

Die enzymatische Sialylierung von N-Acetyllactosamin durch St6Gal I soll mit zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie verfolgt werden und die kinetischen Parameter durch Progresskurvenanalytik bestimmt werden.

7.3 Ergebnisse und Diskussion

7.3.1 Erstellung eines Modells der Bindung von CMP-Sia an ST6Gal1 und Erstellung einer Moleküldynamiksimulation

Die Bindung von CMP-Sia an ST6Gal1 wurde durch computerunterstützte Rechnungen und MD-Simulationen vorhergesagt. Ausgehend von einem manuell ergänzten Modell des Liganden CMP im Komplex mit ST6Gal I (pdb: 4JS2 (92)) wurde die optimale Bindungsposition für die Liganden CMP-Sia und LacNAc ermittelt. Dafür wurde das Protein mittels des Protein Preparation Wizard 10.4 in Maestro (Schrödinger (93,94)) eingeladen und vorbereitet. Für diesen und alle weiteren Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, die Standardeinstellungen ausgewählt. Nachdem das Kristallwasser entfernt wurde, wurden die fehlenden Wasserstoffatome hinzugefügt und partielle Ladungen mittels eines OPLS-2005 Kraftfelds zugewiesen (95). Protonierungszustände wurden angepasst und die Strukturen einem eingeschränkten Minimierungsprozess unterzogen. Der Ligand CMP wurde in seiner Position manuell erweitert, um das Donorsubstrat CMP-Sia in seiner wahrscheinlichen Position zu erhalten. Eine Dockingstudie mit starrem Rezeptor wurde mit dem *standard precision* Mode des Schrödinger Plug-Ins Glide (96-98) durchgeführt, um günstige Wechselwirkungen zwischen dem erstellten Liganden und der Sialyltransferase zu erkennen. Die Konformation mit der höchsten Docking-Score wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Diese Konformation von CMP-Sia im Komplex mit ST6Gal I wurde mittels des MacroModel-Moduls von Schrödinger (99) einer Energieminimierung unterzogen. Es wurde für die Minimierung mit 500 Iterationen ein Polak-Ribier Conjugate Gradient (100) ausgewählt. Nach der Minimierung wurde der Komplex in Ligand und Rezeptor unterteilt. Sowohl der gesamte Komplex als auch die beiden Untereinheiten wurden einer Energieberechnung durch das MacroModel Modul unterzogen.

Es wurde dabei darauf geachtet, dass ein für einen S_N2 -Angriff geeigneter Abstand von etwa 3.3 Å zwischen dem C-2 des Neuraminsäureteils von CMP-Sia und dem 6'-Hydroxyl der Galaktoseeinheit des Akzeptors, hier Gal-GlcNAc-Man, eingehalten wurde (siehe Abbildung 38). Es wurde eine Wirkung des His-370 als katalytische Base vorhergesagt, dies konnte aber weder bestätigt noch verneint werden. Die negative Ladung der Neuraminsäure in einem Abstand von 3.4 Å zur positiven des protonierten His370 würde eine mögliche katalytische Wirkung jedoch untermauern.

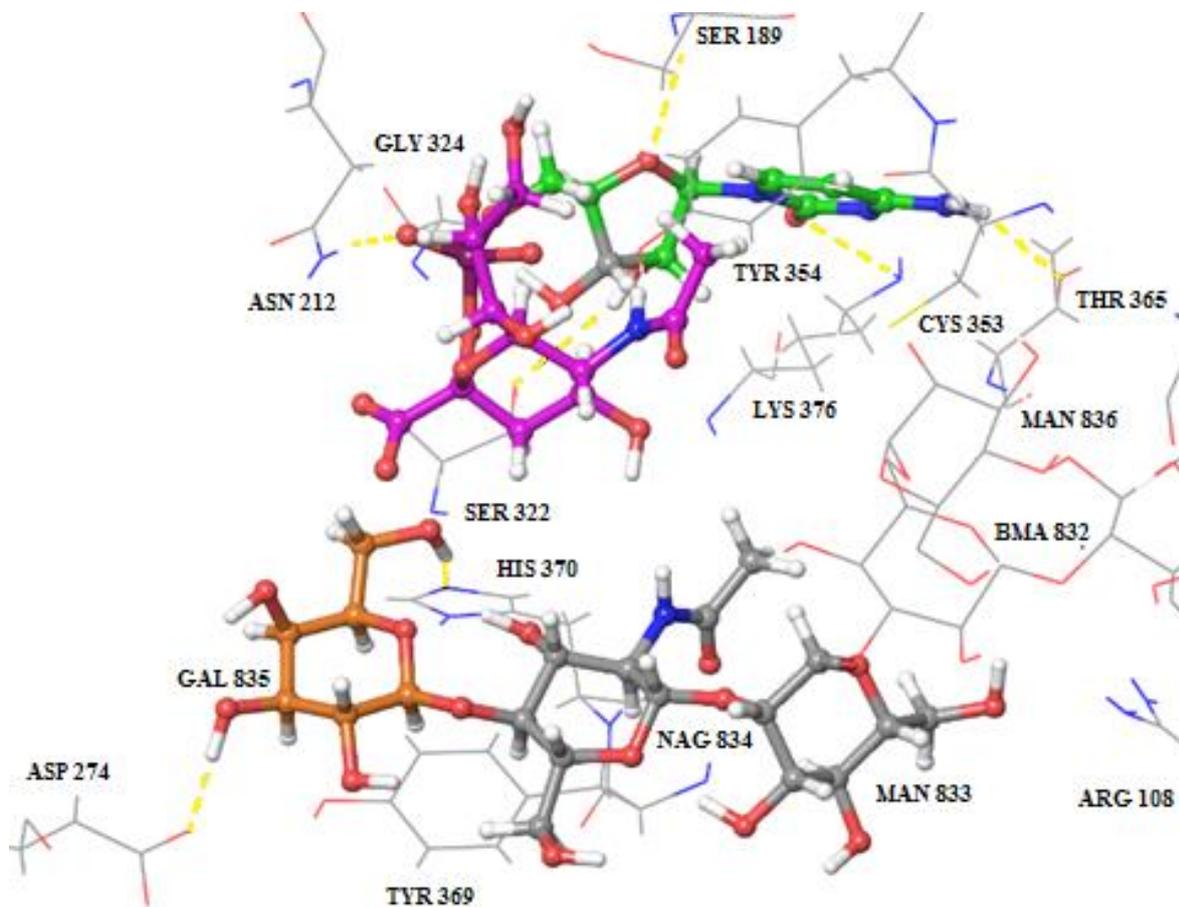


Abbildung 38: CMP-Sia (CMP-Teil in grün, Neuraminsäureteil in magenta) und dem terminalen Ausschnitt eines Akzeptorsubstrats (Galaktoseeinheit in orange und *N*-Acetylglucosamin- und Manoseeinheit in grau) in Komplex mit ST6Gal1. Gelbe gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Ligand.

Ausgehend von diesen Daten wurde mit dem PlugIn Desmond eine MD-Simulation durchgeführt (99,101). Dazu wurde der Protein-Ligandkomplex in eine SPC (*simple point charge*) Wasserbox, die mindestens 10 Å über die Grenzen des Komplexes herausragt, getaucht. Es wurden 3 Cl⁻-Ionen zur Neutralisierung hinzugefügt und die Salzkonzentration auf 0.15 M NaCl eingestellt. Die Simulation wurde im NPT Ensemble bei 310 K und 1.013 bar durchgeführt. Es wurden in 0.5 ps Abständen die Energie und in 0.5 ps die Trajektorien über einen Gesamtzeitraum von 1.2 ns aufgezeichnet (siehe Abbildung 39). Es kann daraus geschlossen werden, dass der Ligand fest in der Bindungstasche liegt und die gewählte Position realistisch ist.

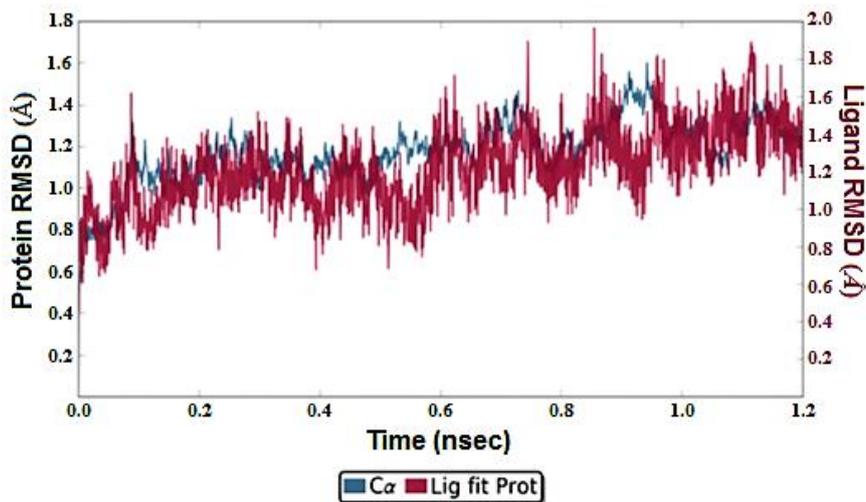


Abbildung 39: Zeitabhängiger Verlauf des RMSD von CMP-Sia im Komplex mit ST6Gal I in der Gegenwart von LacNac. Die RMSD-Werte sind zum RMSD-Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ referenziert. Der RMSD-Verlauf des Liganden ist in rot und der des Proteins in blau dargestellt.

Die Interaktionen zwischen dem Liganden CMP-Sia und ST6Gal I während der MD Simulation wurden auf ihre Stabilität untersucht (Abbildung 40). So wurden Interaktionen zwischen Asn-233 und Ser-323 mit der Carboxylgruppe des Neuraminsäurerestes zu mehr als 95% der Zeit beobachtet. Außerdem gab es stabile Interaktion von Asn-212 mit der Phosphatgruppe und der Aminogruppe des Cytidins mit Cys-353. Die besonders stabilen Interaktionen im Bereich des Phosphats und der Carboxylgruppe stehen im Einklang mit der guten Sättigungsübertragung während der STD-Experimente auf das H-3^{ax}. Auch weitere hohe Sättigungsübertragungsraten wie auf die N-Acetylgruppe (C=O der Acetylgruppe mit Tyr-354) und H-6 des Cytidinteils (benachbart die stabile Interaktion mit Cys-353) lassen sich mit stabilen Ligand-Proteinwechselwirkungen gut erklären. Für den Riboseteil konnte nur eine weniger stabile Interaktion mit Ser-322 (41% der Simulationszeit) festgestellt werden. Dies und der hohe durchschnittliche Abstand von 4.6 Å ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der STD-Experimente, die für den Riboseteil nur schwache Sättigungsübertragung ermittelt haben. Die durchschnittlichen Abstände zwischen den interagierenden Atomen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

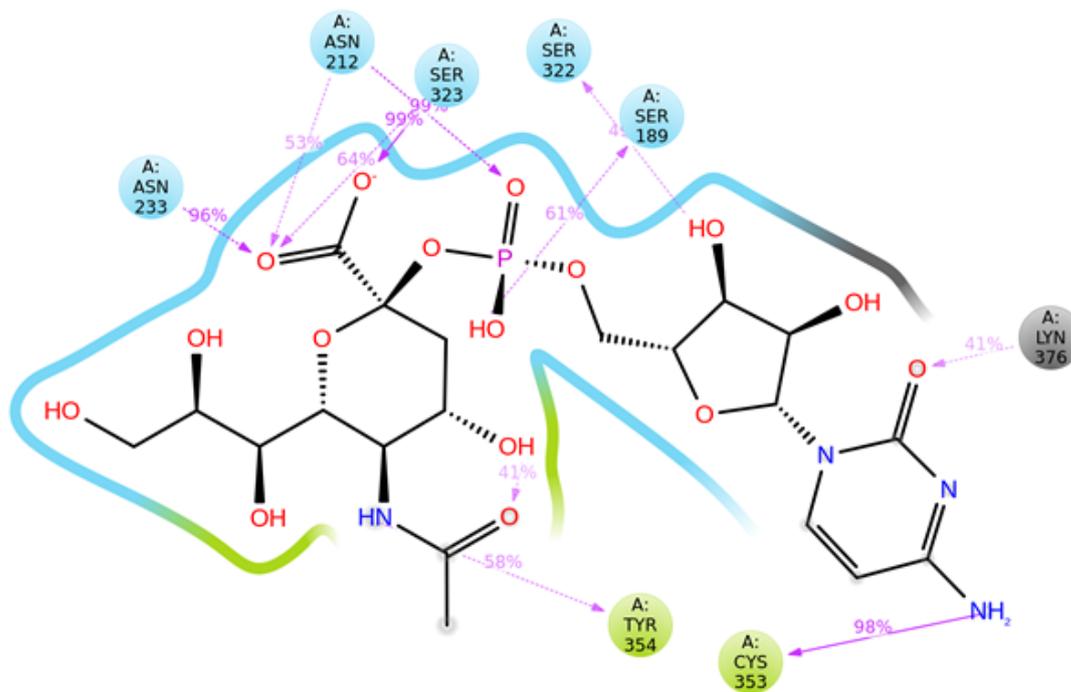


Abbildung 40: Detaillierte, schematische Darstellung der Interaktionen zwischen dem Liganden CMP-Sia und ST6Gal I. Es sind alle Interaktionen gezeigt, die über mindestens 40% der Dauer der MD Simulation bestand haben.

Tabelle 7: Ausgewählte Interaktionen zwischen CMP-Sia und ST6Gal I. Aufgelistet sind die beteiligten Atome oder funktionellen Gruppen, die Art der Interaktion, die durchschnittliche Distanz über die gesamte MD Simulation sowie der prozentuelle Anteil der Zeit, in der der Abstand zwischen den interagierenden Atomen kleiner als 3.6 Å war.

Aminosäure	Funktionelle Gruppe	CMP-Sia Atom	Art der Interaktion	Durchschnittliche Distanz [Å]	Zeitanteil mit Abstand < 3.6 Å
Ser-322	CH ₂	H-3'	Wasserstoffbrückenbindung	4.60 ± 0.01	1.45%
Lys-376	NH ₂	CO (Cytidin)	Wasserstoffbrückenbindung	2.40 ± 0.01	98%
Cys-353	CO	N4	Wasserstoffbrückenbindung	1.80 ± 0.003	100%
Tyr-354	H-ε1	H-6	Wasserstoffbrückenbindung/ Hydrophobe Bindung/ Wasserbrücke	3.60 ± 0.01	68%
Tyr-354	OH	NAc	Wasserstoffbrückenbindung/ Hydrophobe Bindung / Wasserbrücke	5.21 ± 0.01	3.4%
Asn-212	NH ₂	PO ₄	Wasserstoffbrückenbindung	2.62 ± 0.01	100%

7.3.2 Untersuchung der Umsetzung von *N*-Acetyllactosamin durch die Sialyltransferase ST6Gal1

Der enzymatische Transfer der Neuraminsäureeinheit von CMP-Sia auf das Donorsubstrat *N*-Acetyllactosamin (LacNAc) wurde mittels NMR-Spektroskopie verfolgt. Dazu wurde eine Probenlösung mit 225 μM LacNAc 0.5 μM ST6Gal I in einem D_2O -Puffer (20 mM Tris-d11, 150 mM NaCl, pH 6.5) angesetzt. Der Lösung wurden 0.04 $\mu\text{g/ml}$ CD73 zugefügt. CD73 ist eine Nukleotidase, die das Reaktionsprodukt Citidin-5-monophosphat hydrolysiert, welches sonst inhibierend wirkt. Nach Zugabe einer CMP-Sia-Stammlösung wurde eine CMP-Sia-Konzentration von 375 μM erreicht und die Reaktionsverfolgung gestartet. Die Konzentration von CMP-Sia wurde so gewählt, dass sie etwa 2-3mal so groß ist wie alle bisherigen in der Literatur beschriebenen Werte für humane und murine Sialinsäuretransferasen (siehe Tabelle 6). Es wurden ^1H -NMR-Spektren in einem Abstand von 300 s aufgenommen. Es stellte sich heraus, dass die Reaktionszeit für die vollständige Reaktion etwa 50mal länger als erwartet war und so wurde die Verfolgung für 256 h durchgeführt.

ST6Gal I gehört zu den invertierenden Glycosyltransferasen. Es wird dabei die Konfiguration des anomeren Protons der übertragenen Neuraminsäure durch die Bildung der 2,6-glycosidischen Bindung zum LacNAc von der β - zur α -Konfiguration invertiert. Die Reaktion kann an mehreren Stellen sowohl anhand von verschwindenden Signalen der Edukte als auch anhand von erscheinenden Signalen der Produkte verfolgt werden. Es sind mehrere separierte Signale für Edukte und Produkte zu finden (siehe Abbildung 41). So kann die Konzentration des Edukts CMP-Sia anhand der Signale bei δ 7.88 (H-5), δ 6.04 (H-6), δ 5.90 (H-1'), δ 2.40 (H-3''*eq*) und δ 1.56 (H-3''*ax*) verfolgt werden. Für das zweite Edukt LacNAc bietet sich das anomere Proton der Galactoseuntereinheit bei δ 5.12 an. Der Konzentrationsverlauf des Produkts Sia-LacNAc kann anhand des verschobenen Signals des anomeren Protons der Galactoseuntereinheit bei δ 5.11 und anhand der Signale δ 2.59 (H-3''*eq*) und δ 1.63 (H-3''*ax*) verfolgt werden.

Ebenfalls kann die Hydrolyse des Zwischenprodukts CMP durch die Nukleotidase CD73, die CMP in Cytosin und Phosphat spaltet, verfolgt werden. Signale für Cytosin können bei δ 7.75 (H-5), δ 5.97 (H-6) und δ 5.81 (H-1') gefunden werden. Das Zwischenprodukt CMP entsteht ebenfalls aus der Autohydrolyse von CMP-Sia. Dieser Prozess kann über sein zweites Produkt, Neuraminsäure, anhand der Signale δ 2.13 (H-3 *eq*) und δ 1.73 (H-3 *ax*) verfolgt werden.

Als Referenz für die Konzentration diente das Integral des Signals des H-3''*eq*. Nachdem die Konzentrationen für alle Stoffe berechnet waren, wurde durch eine lineare Regression der

ersten Datenpunkte ein Wert für v'_{max} abgeschätzt. Dieser Wert wird für den Start der Berechnung des v'_{max} -Wertes durch den Fit mit Hilfe der Lambert W-Funktion benötigt. Vorherige Experimente zeigten, dass ein Versuch der Anpassung ohne einen Startwert mit passender Größenordnung zu einem komplett falschen oder keinem Ergebnis führt.

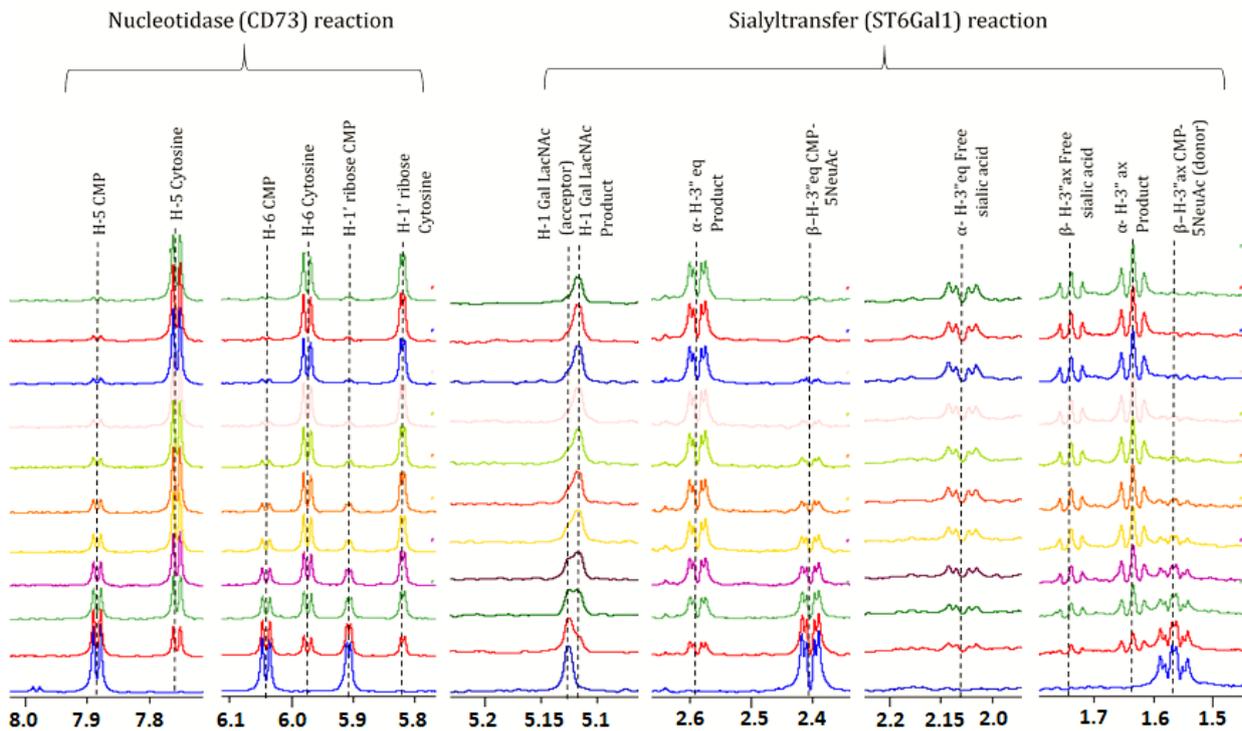


Abbildung 41: Zusammenstellung einiger Ausschnitte der 1H-NMR-Spektren der Umsetzung von CMP-Sia durch die Sialyltransferase ST6Gal1 zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion. Gezeigt sind Ausschnitte, die sich zur Auswertung mittels Progresskurvenanalytik gut eignen. Die Substratkonzentration wurde durch Integration des Integrals des H-3''eq bei $\delta 2.59$ ppm errechnet.

Die enzymatische Reaktion wurde für 265 h beobachtet. Die Konzentrationsveränderungen aller Produkte und Edukte werden in Abbildung 42 gezeigt. Der Zeitraum zwischen den Messpunkten beträgt 6 min. Die Abnahme von CMP-Sia ist auf Grund der Autohydrolyse größer als der Transfer der Neuraminsäure erklärt. Die Autohydrolyse ist etwa halb so schnell wie der Transfer der Neuraminsäure. Am Ende des verfolgten Zeitraums ist die Konzentration von CMP-Sia auf 25 μ M gesunken. Die Abnahme der Donorsubstratkonzentration kann mit der integrierten Form der Michaelis-Menten Gleichung und ihrer Lösung mit Hilfe der Lambert W Funktion beschrieben werden. Dafür wurde die Donorkonzentration um die Autohydrolyse

bereinigt. Dies geschah durch die Subtraktion der Konzentration des Produkts Sia-LacNAc von der Ausgangskonzentration von CMP-Sia (375 μM).

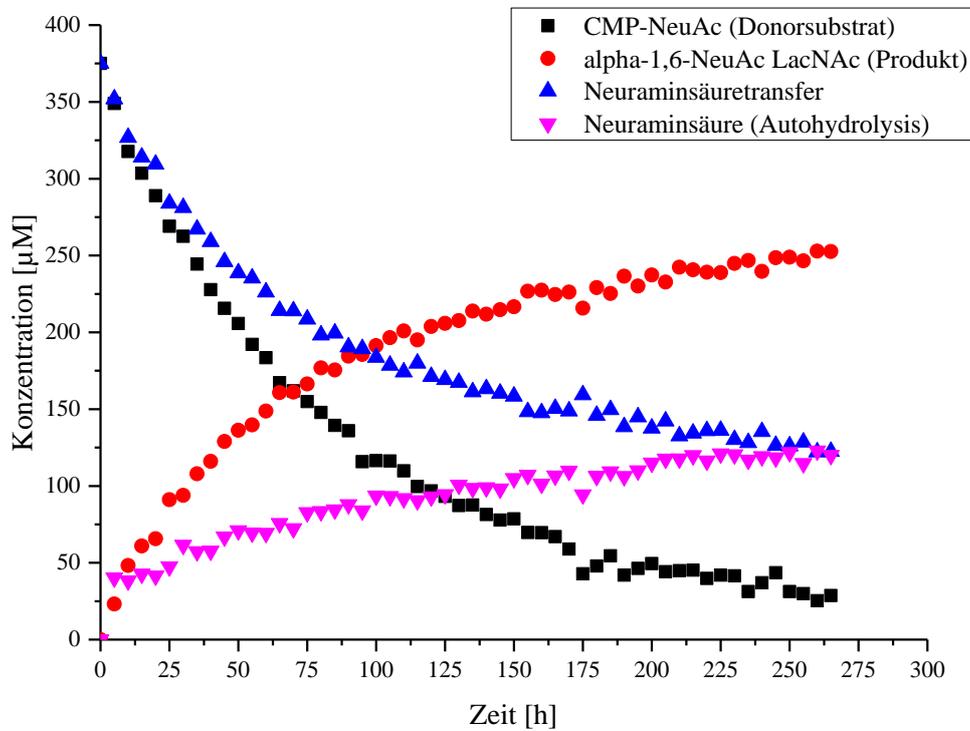


Abbildung 42: Auftragung des zeitlichen Verlaufs der Konzentration während des enzymatischen Transfers der Neuraminsäure von CMP-Sia (schwarze Quadrate) auf das Akzeptorsubstrat LacNAc (Konzentrationsverlauf nicht gezeigt). Bei der Reaktion entsteht α -1,6-NeuAc-LacNAc (rote Kreise). Gleichzeitig kann die Autohydrolyse von CMP-Sia durch die Bildung von Neuraminsäure (lila Dreiecke) beobachtet werden. Ferner wird der Konzentrationsverlauf für den Neuraminsäuretransfer (blaue Dreiecke) durch die Subtraktion der Produktkonzentration von der Anfangskonzentration an CMP-Sia (375 μM) berechnet.

Der erhaltene Konzentrationsverlauf des Neuraminsäuretransfers ist ebenfalls aufgetragen und wurde mit Hilfe des MATLAB[®] Skripts einer Kurvenanpassung an die Lambert-W-Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung unterzogen (Abbildung 43). Es wurde eine apparente Michaelis-Menten-Konstante von $K'_{M, \text{CMP-5NeuAc}} = 333 \pm 5 \mu\text{M}$ und eine apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $v'_{max} = 0.56 \pm 0.03 \text{ nM/s}$ bestimmt.

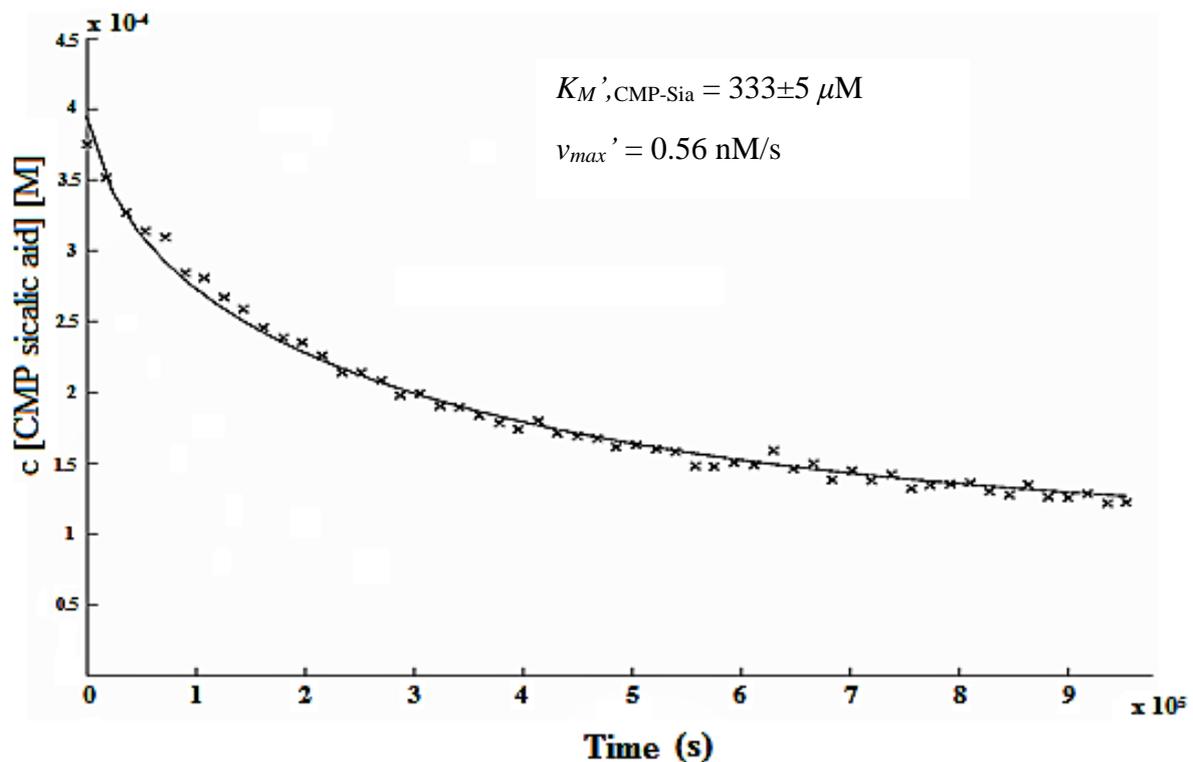


Abbildung 43: Auftragung der Konzentration des Neuraminsäuretransfers und des Fits zur Berechnung der apparenten Michaelis-Mentenkonstante $K'_M = 333 \pm 5 \mu\text{M}$ bezogen auf das Substrat CMP-Sia und der apparenten maximalen Reaktions-geschwindigkeit $v_{max}' = 0.56 \text{ nM/s}$. Dazu wurde ein MATLAB Skript mit der Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten Gleichung verwendet, welches die Lambert W Funktion nutzt.

7.3.3 Untersuchung der Bindung der natürlichen Liganden *N*-Acetyllactosamin und CMP-Sia an die Sialyltransferase ST6Gal1

Die Bindungsstärke von CMP-Sia und LacNAc an ST6Gal I wurde durch separate STD-Titrationsexperimente bestimmt. Dazu wurden $3 \mu\text{M}$ ST6Gal I in $150 \mu\text{L}$ Tris-*d11*-Puffer (20 mM Tris-*d11*, 150 mM NaCl, pH 6.5) in 3 mm NMR-Röhrchen vorgelegt und die Ligandlösungen schrittweise hinzugegeben. Es wurden Standarddatensätze (stddiffesgp.3) mit 1024 scans bei 300 K aufgenommen. Die Länge des *excitation sculptings* und des Sättigungspulses wurde auf je 2 ms eingestellt. Eine Proteinunterdrückung durch einen *Spinlock* ($T_{1\rho}$ mit einer Feldstärke von 11.5 kHz , Dauer von 50 ms) ist ebenfalls in der Sequenz enthalten. Spektren wurden mit einer exponentiellen Gewichtungsfunktion mit einer Halbwertsbreite von 3 Hz prozessiert. Die Auswertung zur Berechnung des K_D -Wertes von CMP-Sia wurde anhand des Integrals des H-6“ durchgeführt. Die erhaltenen STD-Amplifikationswerte sind in

Abbildung 44 gegen die eingesetzte Ligandkonzentration aufgetragen. Die Kurvenanpassung der Daten an das *one-site binding Modell* ergibt $K_D = 4.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$.

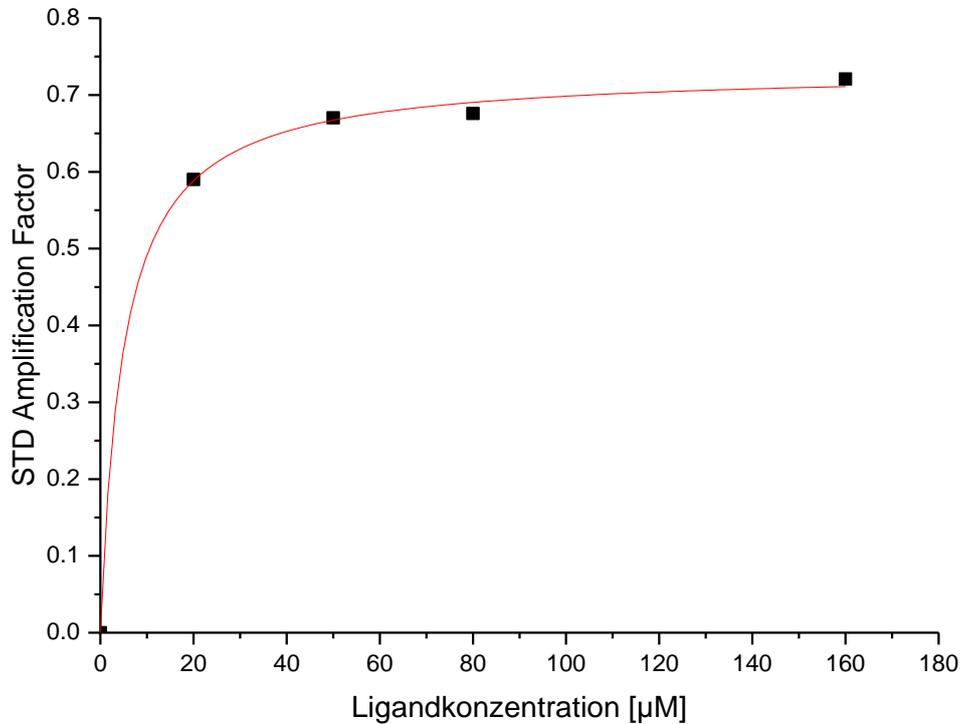


Abbildung 44: Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors gegen die Konzentration von CMP-Sia und Kurvenanpassung an das *one-site binding Modell*. Der STD-Amplifikationsfaktor ist anhand des Integrals des H-6“ berechnet.

Das Titrationsexperiment für LacNAc wurde anhand des Integrals des H-1 GlcNAc ausgewertet. Die Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors gegen die Ligandkonzentration ist in Abbildung 45 gezeigt. Die Kurvenanpassung der Daten an das *one-site binding Modell* ergibt $K_D = 577 \pm 188 \mu\text{M}$.

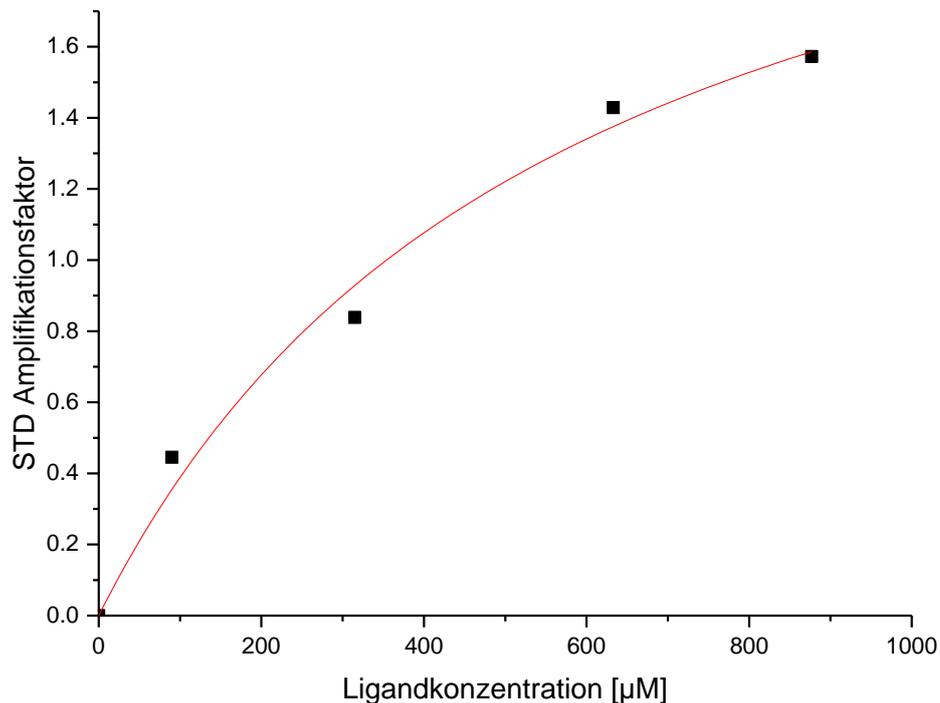


Abbildung 45: Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors gegen die Konzentration von LacNAc und Kurvenanpassung an das *one-site binding Modell*. Der STD-Amplifikationsfaktor ist anhand des Integrals des H-1 GlcNAc berechnet.

Für den Liganden CMP-Sia wurde ein Bindungsepitop erstellt. Dazu wurden alle erhaltenen STD-Amplifikationsfaktoren auf den höchsten Wert des H-3''*ax* normiert (siehe Tabelle 8). Neben dem H-3''*ax* zeigten das H-3''*eq*, die *N*-Acetylgruppe und das H-6 höhere relative STD-Amplifikationsfaktoren. Alle relevanten Werte über 25% sind anhand der Strukturformel in Abbildung 46 graphisch dargestellt. Besser übertragene Sättigung spricht in der Regel für eine größere Nähe zur Proteinoberfläche, was bedeutet, dass vor allem die markierten Protonen tiefer in der Bindungstasche liegen.

Tabelle 8: Absolute und relative STD-Amplifikationsfaktoren des Donorsubstrats CMP-Sia für die Bindung an ST6Gal I

Proton	H3 ^{''eq}	H3 ^{''ax}	H4 ^{''}	H6 ^{''}	H7 ^{''}	H9 ^{''a}	H5 ^{''/8^{''}}	NAc	H1 [']	H2 [']	H3 [']	H4 ^{'/5[']}	H5	H6
Absoluter STD / %	1.43	2.92	0.836	0.721	0.66	0.914	1.13	1.14	0.858	0.893	0.865	0.578	0.349	1.02
Relativer STD / %	49	100	29	25	23	31	39	39	29	31	30	20	12	35

relative STD-Ampl.: ● 50-100%
● 35-49%
● 25-34%

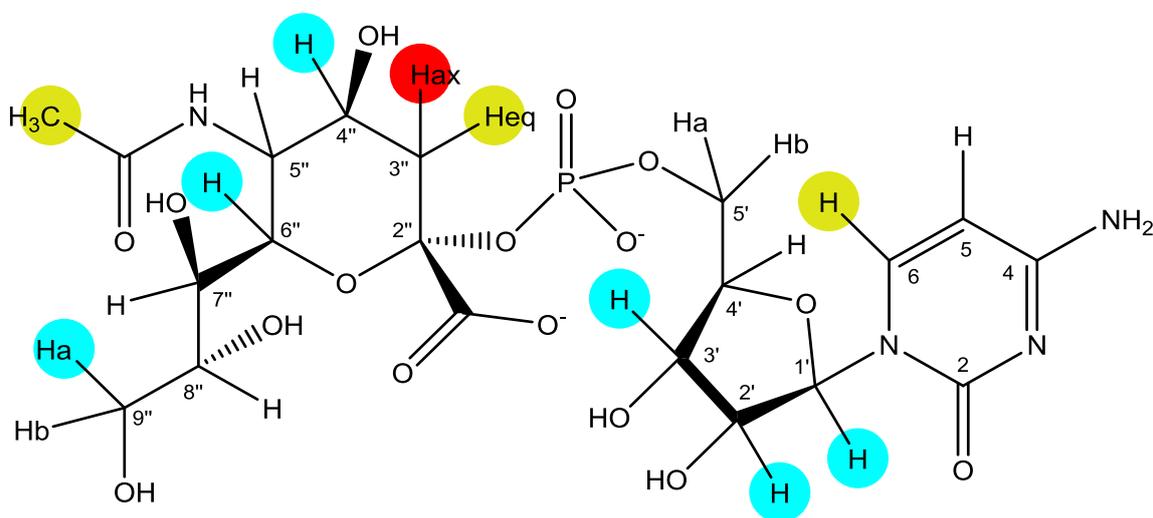


Abbildung 46: *Epitope Mapping* für CMP-Sia für die Bindung an ST6Gal I. Protonen mit hohen relativen STD-Amplifikationsfaktoren (50-100%) sind rot unterlegt, Protonen mit mittleren relativen STD-Amplifikationsfaktoren (35-49%) sind ockerfarben unterlegt und Protonen mit niedrigen relativen STD-Amplifikationsfaktoren (25-34%) sind türkis unterlegt.

8 Evaluation von multivalenten Neoglycokonjugaten auf Basis von Adamantan

8.1 Multivalenz

Multivalente Interaktionen sind in biologischen Systemen weit verbreitet und spielen wichtige Rollen z.B. bei der Zell-Zell-Erkennung, Interaktionen von Viren mit potentiellen Wirtszellen, der DNA-Transkription oder Signalübertragungen. Multivalente Interaktionen setzen sich aus vielen einzelnen, schwachen Bindungen zusammen und zeichnen sich durch sehr hohe Affinitäten und Spezifitäten aus (102).

Die Verknüpfung von Kohlenhydraten an Proteine ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen und spielt in vielen biologischen Prozessen wie der Zell-Zellerkennung, bei Entzündungen, im Immunsystem, bei Infektionen oder der Krebsmetastase eine wichtige Rolle (56,103-105). Viele dieser Glycokonjugate werden von spezifischen Lektinen erkannt. Die Bindungen zwischen Kohlenhydraten und Lektinen sind in der Regel recht schwach, $K_D \sim 0.1 - 10 \text{ mM}$, durch eine Vielzahl solcher schwachen Bindungen können aber sehr starke Wechselwirkungen mit Bindungsstärken im picomolaren oder nanomolaren Bereich ausgebildet werden (106). Durch die geometrische Anordnung auf biologischen Oberflächen wird nicht nur die Affinität, sondern auch die Spezifität stark erhöht (107,108). Viele Lektine besitzen mehr als eine Bindungsstelle für Kohlenhydrate und binden diese in einer diskreten geometrischen Anordnung (109).

Concanavalin A (ConA) ist ein 26 kDa großes Lektin, welches spezifisch die α -Pyranoseform von D-Mannose und D-Glucose bindet (110,111). ConA liegt bei leicht sauren pH-Werten als Dimer mit zwei Bindungsstellen vor und bei physiologischen pH-Werten als Tetramer mit vier Bindungstaschen (112).

8.2 Aufgabenstellung

Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen spielen bei diversen biologischen Prozessen eine Rolle und sind deshalb auch von großer Interesse für die Entwicklung von Wirkstoffen. Multivalente Kohlenhydratstrukturen sind bereits regelmäßig zur Untersuchung dieser Interaktionen eingesetzt worden. Adamantan bietet ein gutes Gerüst für ein trimeres Kohlenhydratkonjugat mit der Möglichkeit einer vierten, unabhängigen Funktionalisierung.

Multivalente Adamantanderivate sollen in Zusammenarbeit mit Carsten Fleck (Fachbereich Chemie, Universität Hamburg), Bernhard Poll (Fachbereich Chemie, Universität Hamburg) und Elisabeth Memmel (Institut für Organische Chemie, Julius Maximilians Universität, Würzburg) auf ihre Bindung an das Lektin Concanavalin A untersucht werden und mit dem Monomer verglichen werden.

Multivalente mit Mannoseeinheiten funktionalisierte Verbindungen mit unterschiedlichen Spacern zwischen Mannoseeinheit und Adamantylgerüst sollen mittels STD-NMR-Spektroskopie auf ihre Bindungseigenschaften untersucht werden. Ferner soll ein Bindungsepitop erstellt werden und mit *in silico* Untersuchungen validiert werden.

8.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Synthese der Verbindungen Neoglycokonjugat A und Neoglycokonjugat B (siehe Abbildung 47) wurde von Carsten Fleck durchgeführt (113).

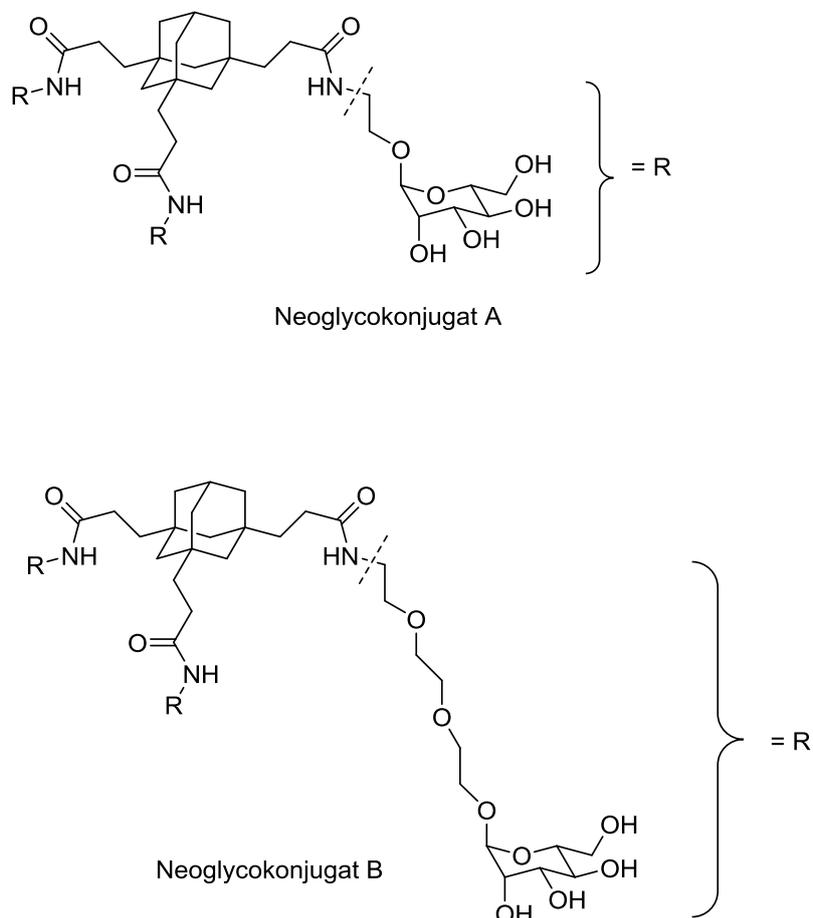


Abbildung 47: Neoglycokonjugat A und Neoglycokonjugat B

Alle Experimente wurden an einem Bruker Avance III HD 600 MHz Spektrometer durchgeführt. Es wurden jeweils 600 μl Lektin ConA mit einer Konzentration von 5 μM (3 nmol) in einem Puffer mit 50 mM NaOAc- d_3 , 1 mM Mg^{2+} und 1 mM Ca^{2+} bei einem pH 4.5 in einem 5 mm NMR-Röhrchen vorgelegt. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K mit einer *exaltation sculpting sequence* und 1024 Scans aufgenommen. Neoglycokonjugat A, B und α -1-O-Methylmannosid wurden jeweils im gleichen Puffersystem gelöst und der Proteinlösung zugegeben um die in den Tabelle 9 aufgeführten Konzentrationen zu erreichen.

Tabelle 9: STD-Titrationen des Lektins ConA mit den Liganden α -1-*O*-Methylmannosid, Neoglycokonjugat A und Neoglycokonjugat B. Aufgeführt sind die Konzentration des Liganden.

Titrationpunkt	α -1- <i>O</i> -Methylmannosid [μ M]	Neoglycokonjugat A [μ M]	Neoglycokonjugat B [μ M]
1	33	33	33
2	66	66	66
3	98	129	98
4	129	190	129
5	190	313	160
6	250	430	222
7	-	545	283

Die Spektren wurden seriell integriert und der STD-Amplifikationsfaktor nach Formel 6 berechnet. Der STD-Amplifikationsfaktor wurde dann gegen die Ligandkonzentration aufgetragen und eine Kurvenanpassung nach dem *one-site binding Modell* durchgeführt. Der K_D wurde nach der Formel 7 berechnet. Zur Bestimmung des Bindungsepitops wurden alle eindeutig interpretierbaren Signale integriert, der STD-Amplifikationsfaktor berechnet und dieser normiert.

Die Bindung von α -1-*O*-Methylmannosid an das Lektin ConA ist bereits untersucht und die Dissoziationskonstante bekannt. Diese Untersuchung mittels ITC (114) ($K_D = 122 \mu\text{M}$) und SPR (115) ($K_D = 100\text{-}200 \mu\text{M}$) wurden in einem Mn^{2+} - und Ca^{2+} -haltigem Puffersystem durchgeführt. Mn^{2+} ist jedoch ein paramagnetisches Kation und kann ein NMR-Experiment erheblich stören, weil die Signalintensitäten durch paramagnetische Relaxationseffekte stark reduziert werden können. Deshalb wurde Mn^{2+} durch Mg^{2+} ersetzt und die Dissoziationskonstante des α -1-*O*-Methylmannosids mittels STD-NMR bestimmt.

Es wurde ein K_D -Wert von $226 \mu\text{M}$ (H-2, siehe Abbildung 48) bestimmt. Dieser ist in guter Übereinstimmung mit den aufgeführten Werten aus früheren Untersuchungen, welche jedoch Mn^{2+} statt des Ersatzes Mg^{2+} einsetzen konnten. Durch diese Untersuchung konnte bestätigt

werden, dass der Austausch des Mn^{2+} -Kations gegen das Mg^{2+} -Kation keinen negativen Einfluss auf die Bindung des α -1-O-Methylmannosids an das Lektin ConA hat.

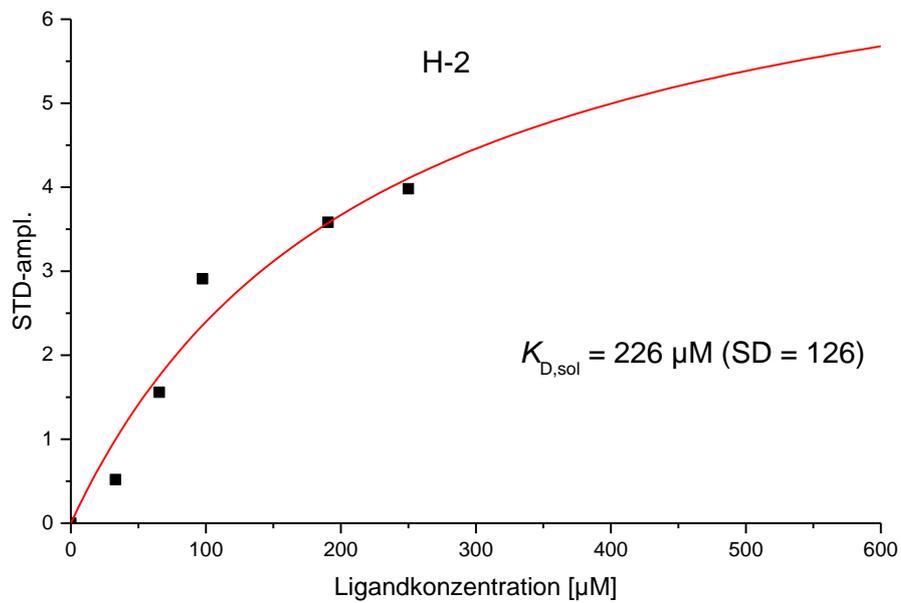


Abbildung 48: Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors des H-2 des α -1-O-Methylmannosids gegen die Ligandkonzentration und Kurvenanpassung nach dem *one-site binding Modell*.

Die Titrations wurden ebenfalls für das Neoglycokonjugat A und B durchgeführt. Es wurde jeweils das H-2 der Mannoseeinheit zur Auswertung ausgewählt, da dieses für alle Substanzen am besten im Spektrum aufgelöst war. Für Neoglycokonjugat A wurde $K_D = 280 \pm 47 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 49) und für Neoglycokonjugat B $K_D = 177 \pm 56 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 50) bestimmt. Die Dissoziationskonstanen der trimeren Verbindungen mit Mannoseeinheiten liegen damit alle im Bereich der monomeren Mannose. Die Länge des Linkers scheint jedoch einen Effekt auf die Bindungsstärke zu haben. Das Neoglycokonjugat B weist einen kleineren K_D -Wert als das Neoglycokonjugat A auf. Da diese Verbindungen sich nur in der Länge des Linkers unterscheiden, scheint die Variante mit längerem Linker einen besseren Fit in die Bindungstasche zu ermöglichen.

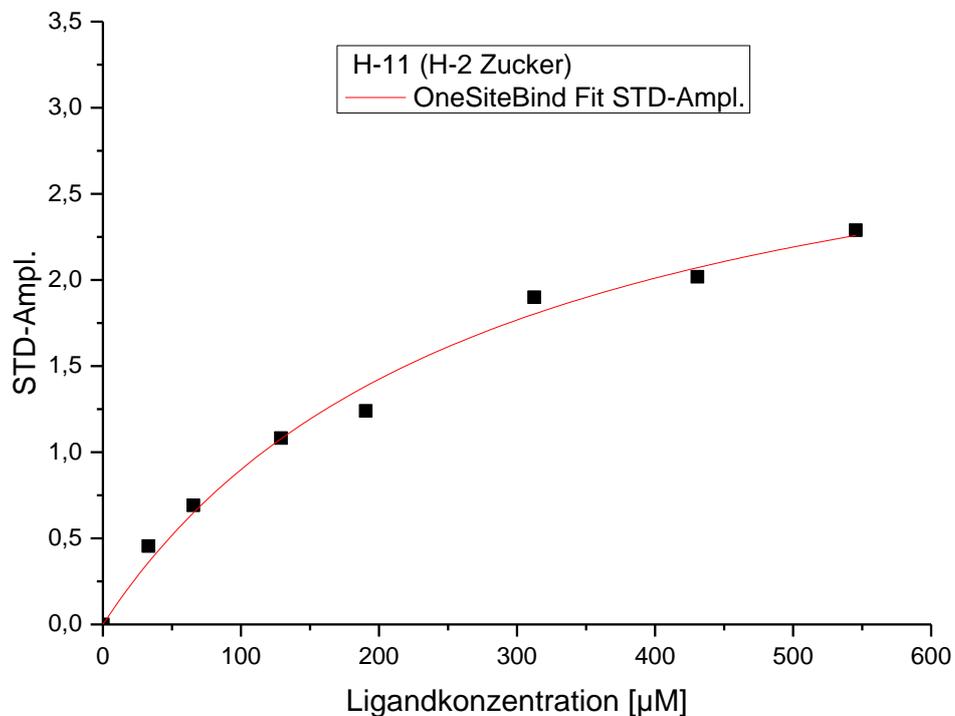


Abbildung 49: Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors des H-11 des Neoglycokonjugats A gegen die Ligandkonzentration und Kurvenanpassung nach dem *one-site binding Modell*.

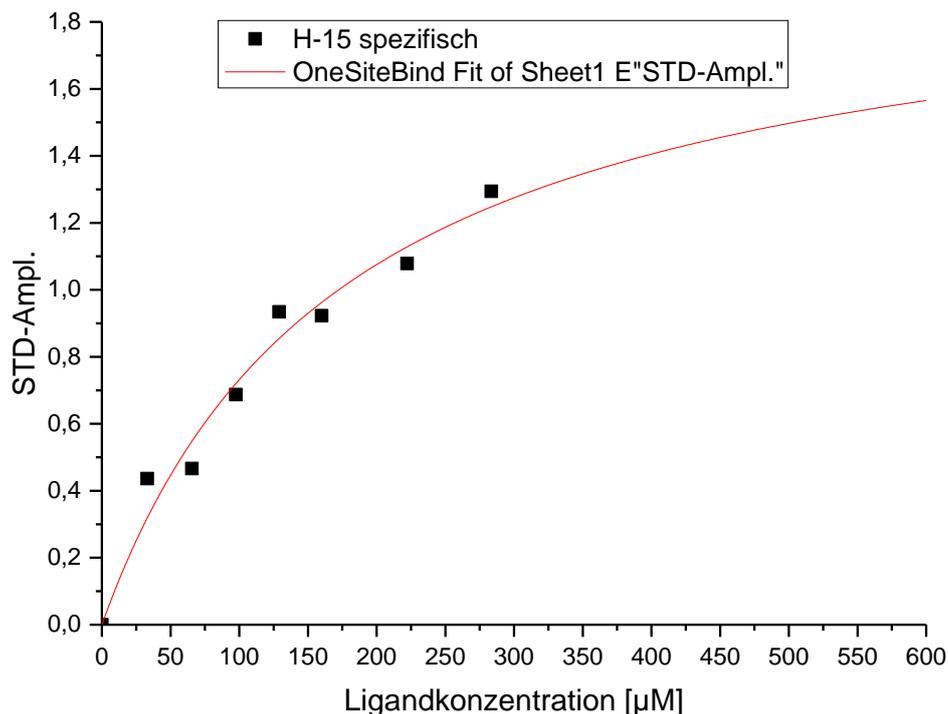


Abbildung 50: Auftragung des STD-Amplifikationsfaktors des H-15 des Neoglycokonjugats B gegen die Ligandkonzentration und Kurvenanpassung nach dem *one-site binding Modell*.

Diese Annahme wird durch die Auswertung des Bindungsepitops untermauert. Die Stärke des relativen STD-Amplifikationsfaktors lässt Rückschlüsse über den Abstand zwischen einem Protein und der Moleküloberfläche zu. Je größer der STD-Amplifikationsfaktor ist, umso näher sind das entsprechende Proton und ein oder mehrere Protonen des Proteins. Das Bindungsepitop des Neoglycokonjugats A weist für die Ringprotonen der Mannoseeinheit unterschiedlich starke relative STD-Amplifikationsfaktoren auf, was auf unterschiedlich lange Abstände und damit keine gute Passung in die Bindungstasche hindeutet (Abbildung 51). Im Gegensatz dazu weisen alle Ringprotonen der Mannoseeinheit im Neoglycokonjugat B starke relative STD-Amplifikationsfaktoren auf (Abbildung 52), was auf kurze Abstände zu Protonen der Proteinoberfläche hindeutet und damit auf eine tiefere Positionierung des Liganden in der Bindungstasche schließen lässt.

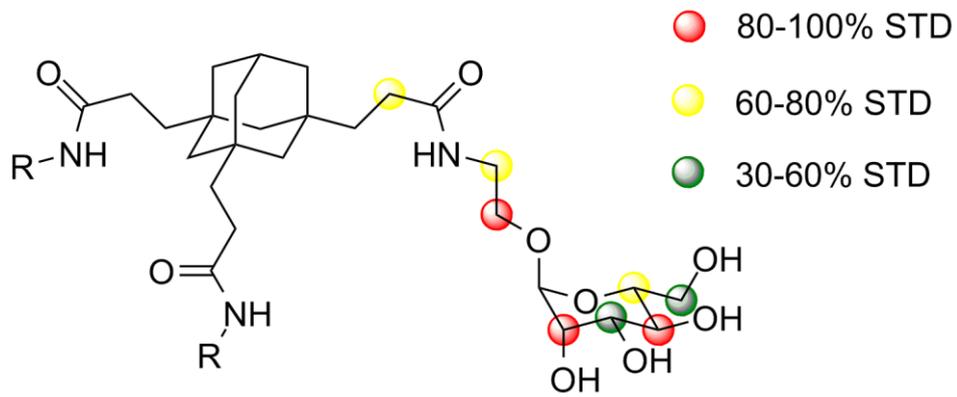


Abbildung 51: Epitopemapping des Neoglycoconjugats A. Rote Kugeln repräsentieren hohe relative STD-Amplifikationsfaktoren mit 80-100%, gelbe Kugeln mittelstarke relative STD-Amplifikationsfaktoren mit 60-80% und grüne Kugeln schwache relative STD-Amplifikationsfaktoren mit 30-60%.

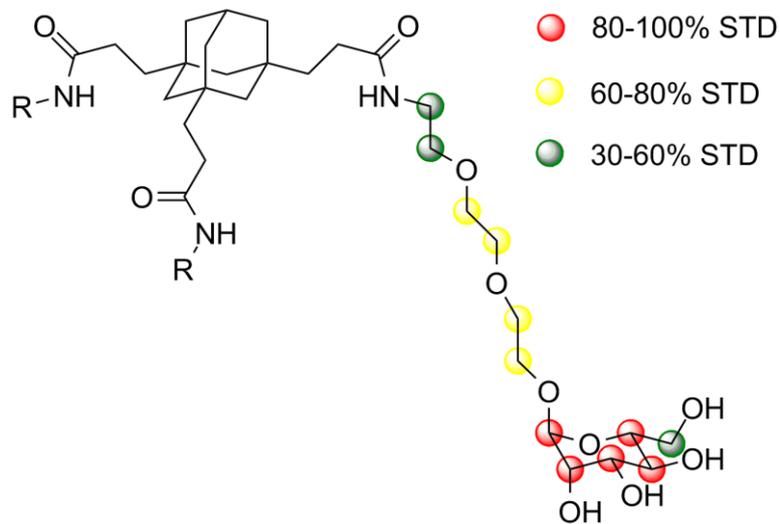


Abbildung 52: Epitopemapping des Neoglycoconjugats B. Rote Kugeln repräsentieren hohe relative STD-Amplifikationsfaktoren mit 80-100%, gelbe Kugeln mittelstarke relative STD-Amplifikationsfaktoren mit 60-80% und grüne Kugeln schwache relative STD-Amplifikationsfaktoren mit 30-60%.

Ein Effekt der multivalenten Möglichkeiten der Neoglycokonjugate A und B konnte unter diesen Bedingungen nicht festgestellt werden. Die einzelnen Proteindimere sind in Lösung vermutlich zu weit entfernt und die einfache Bindung an jeweils mehrere, sich voneinander unabhängig bewegende Proteindimere steigert die Bindungsstärke nicht. Außerdem scheint die Geometrie der beiden Bindungsstellen eines Dimers die Bindung zweier Arme eines Liganden unmöglich zu machen.

Zur Bestimmung einer möglichen multivalenten Bindung wurde von Elisabeth Memmel ein auf Fluoreszenzabsorption basierender Essay mit immobilisiertem ConA durchgeführt (116). Es wurden für ein fluoreszenzmarkiertes Analog des Neoglycokonjugats A ein $K_{D,surf} = 9.04 \pm 6.41 \mu\text{M}$ und für ein fluoreszenzmarkiertes Analog des Neoglycokonjugats B ein $K_{D,surf} = 0.51 \pm 0.23 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Bindung des fluoreszenzmarkierten α -1-O-Methylmannosidanalogs war zu schwach um mit diesem Verfahren bestimmt zu werden.

Die Untersuchung der Bindungskonstanten in Lösung lieferten nur eine schwache Verbesserung der multivalenten Liganden im Vergleich zum α -1-O-Methylmannosid. Die Untersuchungen mit dem fixierten Lectin auf einer Glasoberfläche ergaben jedoch eine große Steigerung der Bindungsstärke der multivalenten Liganden im Vergleich zum α -1-O-Methylmannosid. Dieser Anstieg ist vermutlich auf eine Organisation der Lektincluster zurückzuführen. Dies entspricht auch eher der natürlichen Anordnung der Lektincluster auf einer Zelloberfläche und stellen so ein besseres Modell zur Bewertung der Ligand-Lektin-Interaktion dar.

9 Experimenteller Teil

Tabelle 10: Auflistung der eingesetzten Chemikalien.

Hersteller	Chemikalien
ABCR	Triisopropylsilan
Cambridge Isotope Lab.	TRIS-d11 (98%)
Deutero	Deuteriumoxid (99%), TMSP-2,2,3,3-d4 (99%)
Grüssing	Natriumchlorid, Essigsäureanhydrid
Iris Biotech	Fmoc-L-Ala-OH x H ₂ O, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(tBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-Rink-Amide AM PS-Harz, TBTU, DIPEA, N,N-Dimethylformamid (peptide grade), Piperidin, TFA
Merck	Aceton, Ethanol, Diethylether, tertButylmethylether, Dichlormethan, Ameisensäure, Salzsäure-d1 (etwa 37% DCL in D ₂ O)
R & D Systems	Recombinante humane Fucosyltransferase 2 (Katalog Nr. 7770-GT-020)
Sigma-Aldrich	Acetonitril (gradient grade), S-Adenosyl-L-methioninchlorid, N-Acetyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-β-D-galactosamin Methylglycosid, Guanosin-5'-diphospho-β-L-fucose Natriumsalz

Tabelle 11: Auflistung der eingesetzten Geräte.

Gerät	Gerätetyp	Hersteller	
ESI-TOF	6224 TOF LC/MS	Agilent Technologies	
HPLC-Anlage	1200 Series	Agilent Technologies	
LC-ESI-TOF-MS	6224 TOF LC/MS & 1200 Series	Agilent Technologies	
Mikrowellensyntheseroboter	Liberty 12 & Discover	CEM	
NMR Spektrometer	DRX 500 (11.67 T, ν L(1H) = 499.87 MHz, inverser 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf)	Bruker GmbH	BioSpin
	Avance III HD 600 (14.09 T, ν L(1H) = 600.13 MHz, 5 mm BB Smartprobe)	Bruker GmbH	BioSpin
	Avance I 700 (16.44 T, ν L(1H) = 700.13 MHz, inverser 5 mm Tripelresonanz-Cryoprobenkopf)	Bruker GmbH	BioSpin
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV 18.2 M Ω	SGwater	
RP-HPLC Säule			
-HPLC präparativ-	VP250/21 Nucleodur C18 Isis	Macherey & Nagel	
UV/Vis-Spektrometer	UV-160A	Shimadzu	
Zentrifugen	5417 R, 5804 R	Eppendorf	

Tabelle 12: Auflistung der eingesetzten Programme.

Software	Hersteller
Inkscape 0.48.1.0	open source program
MassHunter Qualitative Analysis B.04.00	Agilent Technologies
LC/MSD Chemstation B.04.03	Agilent Technologies
Topspin 3.2	Bruker Biospin
PepDriver 2.6.6.0	CEM
Origin Pro 8.5	OriginLab
ChemDraw 11.0	PerkinElmer
MATLAB R2022a	MathWorks
Maestro 2.2	Schrödinger

9.1 Expression in Escherechia coli Zellen und Reinigung von Set8-Protein

9.1.1 Transformation der DNA und Erstellen der Zellkultur

Zu gefrorenen *Escherechia coli* (E. coli) BL21 Zellen wurde unter sterilen Bedingungen 2 μ l DNA (70 ng/ μ l) gegeben und für 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Die Zellen wurden dann für 45 s bei 42°C hitzebehandelt und weitere 5 Minuten bei 0°C inkubiert. Es wurden 0.5 ml steriles Wachstumsmedium Luria Broth (LB) zugegeben und 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Zellkultur wurde zu 5 ml sterilem LB gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zu 400 ml sterilem LB wurden 400 μ l sterile 2 M Ampicillin-Lösung und die über Nacht gewachsene Zellkultur gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C für drei Stunden inkubiert. Danach wurden unter sterilen Bedingungen 400 μ l einer 0.5 M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid-Lösung (IPTG) gegeben und über Nacht bei 18°C inkubiert.

Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in Phosphatpuffer (100 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7.4) suspendiert und in ein Falcontube überführt. Es wurde erneut für 10 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden bei -20°C gelagert.

9.1.2 Extraktion und Reinigung von Set8

Die gefrorenen Zellen wurden in 20 ml Phosphatpuffer (100 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7.4) mit 10 mM Imidazol suspendiert und ein Proteaseinhibitor zugegeben. Die Suspension wurde achtmal je 30 s mit Ultraschall behandelt und 30 Minuten bei 4°C und 10 krpm zentrifugiert.

Die Reinigung erfolgte auf einer Nickelaffinitätssäule. Dazu wurde der Überstand auf die Säule aufgetragen und langsam einwirken gelassen. Es wurde mit je 7 ml Phosphatpuffer (100 mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7.4) mit 10 mM, 60 mM und 250 mM Imidazol gewaschen und die Fraktionen aufgefangen. Die Fraktion mit 250 mM Imidazol wurde über Nacht in 200 mM TRIS-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.0) dialysiert.

9.1.3 Extraktion und Reinigung von DNA

Zu gefrorenen *Escherichia coli* (E. coli) DH5 α Zellen wurde unter sterilen Bedingungen 2 μ l DNA (70ng/ μ l) gegeben und für 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Die Zellen wurden dann für 45 s bei 42°C hitzebehandelt und weitere 5 Minuten bei 0°C inkubiert. Es wurden 0.5 ml steriles Wachstumsmedium Luria Broth (LB) zugegeben und 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellkultur wurde zu 5 ml sterilem LB gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen DNA-Extraction kits. Die Zellen wurden in 250 μ l Lösung P1 suspendiert und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Es wurden 250 μ l Lösung P2 und 350 μ l Lösung N3 hinzugegeben und 10 Minuten bei 12500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die QiaPREP SPIM COLUMN überführt und 60 s bei 12500 rpm zentrifugiert. Die Lösung wurde verworfen und 500 μ l Lösung PB hinzugegeben und erneut für 60 s bei 12500 rpm zentrifugiert. Die Lösung wurde verworfen und 750 μ l Lösung PE hinzugegeben. Es wurde für 60s bei 12500 rpm zentrifugiert, die Lösung verworfen und erneut für 120s bei 12500 rpm zentrifugiert. Die *column* wurde in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß überführt, 50 μ l Lösung EB hinzugegeben und für 120 s stengelassen. Es wurde für 120 s bei 12500 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der DNA ($c = 74$ ng/ μ l) in der Lösung wurde mittels NANODROP bestimmt.

9.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Peptidsynthese

9.2.1 Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield

Alle eingesetzten Reagenzien wurden vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht. Das Harz wurde am Vortag abgewogen und über Nacht bei Raumtemperatur in DMF quellen gelassen. Die Aminosäuren- (0.5 M in DMF), Aktivator- (0.5 M TBTU in DMF), Capping- (10% Ac₂O in DMF) und Abspalllösungen (20% Piperidin in DMF) wurden der Synthesevorschrift entsprechend angesetzt. Alle Synthesen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit zwei Kupplungsschritten und anschließendem Cappingsschritt durchgeführt.

9.2.2 Fmoc-Abspaltung und Bestimmung der Rohausbeute mittels UV-Spektroskopie

Das Harz wurde getrocknet und mehrmals mit DMF gewaschen. Danach wurde zweimal mit je 4 ml Abspalllösung versetzt und das Harz jeweils 20 Minuten inkubiert. Es wurde viermal mit je 4 ml DMF gewaschen und die Wasch- und Abspalllösungen vereinigt. Diese wurden 1:20 bzw. 1:40 mit DMF verdünnt und die Absorption bei 301 nm bestimmt. Die Rohausbeute kann nach Formel 15 berechnet werden.

$$n_{\text{Fluoren}} = \frac{OD \cdot V}{d \cdot \epsilon} \cdot F$$

Formel 15: Berechnung der Rohausbeute über den Absorptionswert bei 301 nm mit n_{Fluoren} = Stoffmenge Fluoren, OD = gemessene Absorption, V = Gesamtvolumen der vereinigten Abspalllösungen (0.02 l), d = Schichtdicke der Küvette (1 cm), ϵ = molarer Extinktionskoeffizient (7950 l/mol·cm) und F = Verdünnungsfaktor.

9.2.3 Abspaltung vom Harz und Entschützung der Seitenketten

Das Harz wurde mehrmals mit DCM gewaschen und getrocknet. Das trockene Harz wurde zweimal mit je 4 ml TFA/TIPS/H₂O (95:5:2) für 90 Minuten inkubiert und anschließend viermal mit TFA gewaschen. Die Lösungen wurden vereinigt und im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in etwas Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

9.2.4 Etherextraktion

Das Rohprodukt wurde mit 5 ml gekühltem *tert*-Butylmethylether versetzt und zentrifugiert. Die Lösung wurde dekantiert, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

9.2.5 Reinigung mittels RP-HPLC

Die Reinigungen der Peptide wurden mittels HPLC durchgeführt. Als Laufmittel wurden Gradienten mit folgenden Laufmitteln verwendet:

Laufmittel A: 100:0.1 H₂O/Ameisensäure

Laufmittel B: 5:95:0.1 H₂O/Acetonitril/Ameisensäure

Rohprodukte wurden in so viel Laufmittel A gelöst, dass Lösungen mit einer Konzentration von 10-20 mg/ml injiziert werden konnten. Die Detektion der Produkte erfolgte mittels UV-Spektroskopie (Absorption bei 215 nm) und massenspektrometrisch. Die Fraktionen mit Produkt wurden gegebenenfalls im Vakuum eingeeengt und dann gefriergetrocknet.

9.2.6 Probenpräparation und NMR-Messungen zur Charakterisierung

Die Messungen wurden am DRX 500 Spektrometer durchgeführt. Es wurden etwa 1-2 mg Probe in etwa 0.6 ml H₂O/D₂O (9:1, pH = 3 bzw. pH = 2.1 für sehr basische Peptide) gelöst. Es wurden folgende Pulsprogramme benutzt:

¹ H	zgesgp
TOCSY	dipsi2esgpph
ROESY	roesyegpph

Die Spektren wurden bei 300 K aufgenommen.

9.3 *Synthese des Peptids RHRAVL*

Summenformel: C₃₂H₅₉N₁₅O₆

Molmasse: 749.92 g/mol

Für die Peptidsynthese wurde eine Ansatzgröße von 0.1 mmol gewählt und 104 mg Rink Amid AM-Linker funktionalisiertes Polystyrolharz mit einer möglichen Belegung von 0.72 mmol/g vorgelegt. Das Harz wurde in 5 ml DMF über Nacht bei Raumtemperatur quellen gelassen. Die Einwaagen für die Aminosäurelösungen sind in Tabelle 13 aufgeführt. Es wurden ferner als Aktivatorlösungen 1.2 ml DIPEA in 6 ml DMF und 1.59 g TBTU in 10 ml DMF gelöst. Für die Abspaltung der Fmoc-Gruppen wurde eine Lösung von 6 ml Piperidin in 24 ml DMF angesetzt und für die *Cappingschritte* eine Lösung von 1.0 ml Essigsäureanhydrid in 9 ml DMF.

Tabelle 13: Einwaagen für die Synthese des Peptids RHRAVL.

AS	Einwaage AS [g]	DMF (117)
R	1.14	3.6
H	0.35	1.2
L	0.21	1.2
V	0.20	1.2
A	0.19	1.2

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte zweifach durch Zugabe von je 2 ml der Abspalllösung und Schütteln für 10 Minuten bei 50 °C. Die Kupplungen von Alanin, Leucin und Valin erfolgten jeweils zweifach durch Zugabe von 0.6 ml der entsprechenden Aminosäurelösung, 0.6 ml TBTU-Lösung und 0.3 ml DIPEA-Lösung und Schütteln für 30 Minuten bei 50 °C. Die Kupplung von Histidin erfolgte zweifach durch die Zugabe von 0.6 ml Histidinlösung, 0.6 ml TBTU-Lösung und 0.3 ml DIPEA-Lösung. Es wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Argininkupplungen erfolgten dreifach. Dazu wurden jeweils 0.6 ml Argininlösung, 0.6 ml TBTU-Lösung und 0.3 ml DIPEA-Lösung hinzugegeben und 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach den Kupplungen wurde

durch Zugabe von 1.5 ml *Cappinglösung* und Schütteln für 10 Minuten bei 50 °C unerwünschte Kettenverlängerungen abgebrochen. Nach jedem Schritt wurde mehrfach mit DMF gewaschen.

Die letzte Fmoc-Abspaltung wurde zur Bestimmung der Rohausbeute nach AAV2 durchgeführt. Die Abspaltung des Rohprodukts erfolgte nach AAV3 und eine Reinigung durch Etherextraktion nach AAV4. Die weitere Reinigung erfolgte an der HPLC nach AAV5. Es wurde der in Tabelle 14 aufgeführte Lösungsmittelgradient verwendet. Es wurden 25.3 mg Rohprodukt in 3 ml Laufmittel A gelöst, steril filtriert und drei Trennungen mit je 700 µl Injektionsvolumen durchgeführt.

Tabelle 14: Gradient für die Reinigung des Peptids RHRAVL mittels HPLC.

Zeit [min]	Anteil Laufmittel B
5	0%
10	20%
15	50%
20	100%
23	100%

Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Es wurden 9.8 mg (13 µmol, 33% bezogen auf die Ansatzgröße der HPLC-Trennung) farbloses Produkt erhalten. Die Charakterisierung des Produkts erfolgte nach AAV 6. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Zuordnung der ^1H -NMR-Signale des Peptids RHRAVL.

Aminosäure	NH	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ
Arg	-	3.915	1.771	1.487	3.135	7.106	-
His	8.903	4.576	3.110/3.082	-	7.182	-	8.469
Arg	8.445	4.142	1.656/1.597	1.474	3.043	7.078	-
Ala	8.323	4.180	1.220	-	-	-	-
Val	8.048	3.940	1.911	0.781	-	-	-
Leu	8.179	4.188	1.500	1.439	0.769/0.719	-	-

9.4 Synthese des Peptids RHRKVL

Summenformel: C₃₅H₆₆N₁₆O₈

Molmasse: 807.00 g/mol

Für die Peptidsynthese wurde eine Ansatzgröße von 0.05 mmol gewählt und 51 mg Rink Amid AM-Linker funktionalisiertes Polystyrolharz mit einer möglichen Belegung von 0.72 mmol/g vorgelegt. Das Harz wurde in 5 ml DMF über Nacht bei Raumtemperatur quellen gelassen. Die Einwaagen für die Aminosäurelösungen sind in Tabelle 16 aufgeführt. Es wurden ferner als Aktivatorlösungen 0.6 mL DIPEA in 2.4 ml DMF und 0.95 g TBTU in 6 ml DMF gelöst. Für die Abspaltung der Fmoc-Gruppen wurde eine Lösung von 6 ml Piperidin in 24 ml DMF angesetzt und für die *Cappings*schritte eine Lösung von 1.2 ml Essigsäureanhydrid in 10.8 ml DMF.

Tabelle 16: Einwaagen für die Synthese des Peptids RHRKVL.

AS	Einwaage AS [g]	DMF (117)
R	0.64	2.0
H	0.31	1.0
L	0.17	1.0
V	0.16	1.0
K	0.23	1.0

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte zweifach durch Zugabe von je 2 ml der Abspalllösung und Schütteln für 10 Minuten bei 50 °C. Die Kupplungen von Alanin, Leucin, Valin und Lysin erfolgten jeweils zweifach durch Zugabe von 0.5 ml der entsprechenden Aminosäurelösung, 0.5 ml TBTU-Lösung und 0.25 ml DIPEA-Lösung und Schütteln für 30 Minuten bei 50 °C. Die Kupplung von Histidin erfolgte zweifach durch die Zugabe von 0.5 ml Histidinlösung, 0.5 ml TBTU-Lösung und 0.25 ml DIPEA-Lösung. Es wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Argininkupplungen erfolgten zweifach. Dazu wurden jeweils 0.5 ml Argininlösung, 0.5 ml TBTU-Lösung und 0.25 ml DIPEA-Lösung hinzugegeben und 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach den Kupplungen wurde

durch Zugabe von 2 ml *Cappinglösung* und Schütteln für 10 Minuten bei 50 °C unerwünschte Kettenverlängerungen abgebrochen. Nach jedem Schritt wurde mehrfach mit DMF gewaschen. Die letzte Fmoc-Abspaltung wurde zur Bestimmung der Rohausbeute nach AAV2 durchgeführt. Die Abspaltung des Rohprodukts erfolgte nach AAV3 und eine Reinigung durch Etherextraktion nach AAV4. Die weitere Reinigung erfolgte an der HPLC nach AAV5. Es wurde allerdings folgender Lösungsmittelgradient verwendet Tabelle 17. Es wurden 35 mg Rohprodukt in 3 ml Laufmittel A gelöst, steril filtriert und drei Trennungen mit je 700 µl Injektionsvolumen durchgeführt.

Tabelle 17: Gradient für die Reinigung des Peptids RHRKVL mittels HPLC.

Zeit [min]	Anteil Laufmittel B
5	0%
10	20%
15	50%
20	100%
23	100%

Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Es wurden 9.4 mg (12 µmol, 27% bezogen auf die Ansatzgröße der HPLC-Trennung) farbloses Produkt erhalten. Die Charakterisierung des Produkts erfolgte nach AAV 6. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Zuordnung der ^1H -NMR-Signale des Peptids RHRKVL.

Aminosäure	NH	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H z
Arg	-	3.900	1.767	1.483	3.064	7.094	-
His	8.879	4.593	3.122/3.048	-	7.177	-	8.464
Arg	8.455	4.163	1.622	1.462	3.041	7.066	-
Lys	8.350	4.151	1.616	1.263	1.548	2.844	-
Val	8.130	3.948	1.907	0.782	-	-	-
Leu	8.218	4.181	1.480	1.480	0.777/0.716	-	-

9.5 Synthese des Peptids RHRKVLRD

Summenformel: C₄₅H₈₃N₂₁O₁₀

Molmasse: 1077.66 g/mol

Für die Peptidsynthese wurde eine Ansatzgröße von 0.1 mmol gewählt und 105 mg Rink Amid AM-Linker funktionalisiertes Polystyrolharz mit einer möglichen Belegung von 0.72 mmol/g vorgelegt. Das Harz wurde in 5 ml DMF über Nacht bei Raumtemperatur quellen gelassen. Die Einwaagen für die Aminosäurelösungen sind in Tabelle 19 aufgeführt. Es wurden ferner als Aktivatorlösungen 1.2 mL DIPEA in 6 ml DMF und 2.04 g TBTU in 12.8 ml DMF gelöst. Für die Abspaltung der Fmoc-Gruppen wurde eine Lösung von 6.5 ml Piperidin in 26 ml DMF angesetzt und für die *Cappingschritte* eine Lösung von 1.6 ml Essigsäureanhydrid in 14.4 ml DMF.

Tabelle 19: Einwaagen für die Synthese des Peptids RHRKVLRD.

AS	Einwaage AS [g]	DMF (117)
R	1.74	5.6
H	0.56	1.8
K	0.41	1.8
L	0.30	1.8
V	0.29	1.8
D	0.37	1.8

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte zweifach durch Zugabe von je 2 ml der Abspalllösung und Schütteln für 10 Minuten bei 50 °C. Die Kupplungen von Alanin, Leucin, Valin und Asparaginsäure erfolgten jeweils zweifach durch Zugabe von 0.8 ml der entsprechenden Aminosäurelösung, 0.8 ml TBTU-Lösung und 0.4 ml DIPEA-Lösung und Schütteln für 30 Minuten bei 50 °C. Die Kupplung von Histidin erfolgte zweifach durch die Zugabe von 0.8 ml Histidinlösung, 0.8 ml TBTU-Lösung und 0.4 ml DIPEA-Lösung. Es wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Argininkupplungen erfolgten zweifach. Dazu wurden jeweils 0.8 ml Argininlösung, 0.8 ml TBTU-Lösung und 0.4 ml DIPEA-Lösung

hinzugegeben und 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach den Kupplungen wurde durch Zugabe von 2 ml *Cappinglösung* und Schütteln für 10 Minuten bei 50 °C unerwünschte Kettenverlängerungen abgebrochen. Nach jedem Schritt wurde mehrfach mit DMF gewaschen.

Die letzte Fmoc-Abspaltung wurde zur Bestimmung der Rohausbeute nach AAV2 durchgeführt. Die Abspaltung des Rohprodukts erfolgte nach AAV3 und eine Reinigung durch Etherextraktion nach AAV4. Die weitere Reinigung erfolgte an der HPLC nach AAV5. Es wurde der in Tabelle 20 aufgeführte Lösungsmittelgradient verwendet. Es wurden 30 mg Rohprodukt in 3 ml Laufmittel A gelöst, steril filtriert und eine Trennung mit 500 µl Injektionsvolumen und drei Trennungen mit je 700 µl Injektionsvolumen durchgeführt.

Tabelle 20: Gradient für die Reinigung des Peptids RHRKVLRD mittels HPLC.

Zeit [min]	Anteil Laufmittel B
5	0%
10	20%
15	50%
20	100%
23	100%

Die Produktfraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Es wurden 5.7 mg (5.3 µmol, 22% bezogen auf die Ansatzgröße der HPLC-Trennung) farbloses Produkt erhalten. Die Charakterisierung des Produkts erfolgte nach AAV 6. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: Zuordnung der ¹H-NMR-Signale des Peptids RHRKVLRD.

Aminosäure	NH	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ
Arg	-	3.919	1.774	1.486	3.063	7.144	-
His	8.921	4.605	3.142/3.058	-	7.189	-	8.437
Arg	8.502	4.164	1.635	1.476	3.047	7.125	-
Lys	8.363	4.155	1.612	1.270	1.540	2.848	-
Val	8.112	3.934	1.881	0.764	-	-	-
Leu	8.253	4.230	1.457	1.451	0.772/0.713	-	-
Arg	8.240	4.172	1.658	1.461	3.043	7.053	-
Asp	8.271	4.515	2.690	-	-	-	-

9.6 *Synthese des Peptids AKRHRKVLRD*

Summenformel: C₅₄H₁₀₀N₂₄O₁₂

Molmasse: 1277.53 g/mol

Das Peptid AKRHRKVLRD stand noch in ausreichender Menge aus einer vorherigen Arbeit (49) zur Verfügung und wurde nicht erneut synthetisiert.

9.7 STD-Titrations

9.7.1 STD-Titration verschiedener Peptide in Anwesenheit der Methyltransferase Set8

Alle NMR-Experimente wurden in einem 5 mm-NMR-Röhrchen mit 600 μ l Pufferlösung (50 mM Tris-*d11*, 50 mM NaCl, 2 mM NaN₃ und 350 μ M TMSP-*d4* in D₂O) mit 25 μ g (entspricht einer Konzentration von 2.25 μ M) Set8 durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit verd. DCl auf 8.0 eingestellt.

Die Messungen erfolgten mit dem Pulsprogram *stdiffespg.3*. Das Pulsprogramm enthält neben den Sättigungspulsen einen *Spinlock* zur Unterdrückung der Proteinsignale sowie eine Sequenz zur Unterdrückung des Lösungsmittelsignals. Als Sättigungspuls dienten 50 ms *gauss1.1000*-Pulse mit einer Stärke von 30 dB. Im *off-resonance* Spektrum wurde für die Sättigungspulse ein Einstrahlpunkt von 40 ppm, im *on-resonance* Spektrum ein Einstrahlpunkt von -0.33 ppm gewählt. Es wurde ein TOCSY-Spinlock(T_{1 ρ} mit einer Feldstärke von 11.5 kHz, Dauer von 50 ms) verwendet. Die Messung erfolgte bei 310 K mit 2048 *Scans* und einem Relaxationsdelay von 2s.

9.7.1.1 STD-Titration des Peptids RHRAVL in Anwesenheit der Methyltransferase Set8

Durch Zugabe einer 8.13 mM Lösung des Peptids RHRAVL wurden die in Tabelle 22 aufgeführten Protein- und Ligandkonzentrationen erhalten.

Tabelle 22: Auflistung der Konzentrationen des Peptids RHRAVL und der Methyltransferase Set8 für die Titrationspunkte der STD-Titration.

Titrationpunkt	Set 8 [μM]	RHRAVL [μM]
1.	2.24	40.5
2.	2.23	80.5
3.	2.22	120
4.	2.21	159
5.	2.20	198
6.	2.18	275
7.	2.16	350
8.	2.11	496

9.7.1.2 STD-Artefakte des Peptids RHRAVL

Durch Zugabe von 39 μl einer 8.13 mM Lösung des Peptids RHRAVL wurden die maximale Ligandkonzentration der STD-Titration von 496 μM erhalten.

9.7.2.1 STD-Titration des Peptids RHRKVL in Anwesenheit der Methyltransferase Set8

Durch Zugabe einer 8.01 mM Lösung des Peptids RHRKVL wurden die in Tabelle 23 aufgeführten Protein- und Ligandkonzentrationen erhalten.

Tabelle 23: Auflistung der Konzentrationen des Peptids RHRKVL und der Methyltransferase Set8 für die Titrationspunkte der STD-Titration.

Titrationspunkt	Set8 [μM]	RHRKVL [μM]
1.	2.64	39.9
2.	2.63	79.3
3.	2.62	118
4.	2.61	157
5.	2.59	195

9.7.2.2 STD-Artefakte des Peptids RHRKVL

Durch Zugabe von 15 μl einer 8.01 mM Lösung des Peptids RHRKVL wurden die maximale Ligandkonzentration der STD-Titration von 195 μM erhalten.

9.7.3.1 STD-Titration des Peptids RHRKVLRD in Anwesenheit der Methyltransferase Set8

Durch Zugabe einer 8.00mM Lösung des Peptids RHRAVLRD wurden die in Tabelle 24 aufgeführten Protein- und Ligandkonzentrationen erhalten.

Tabelle 24: Auflistung der Konzentrationen des Peptids RHRKVLRD und der Methyltransferase Set8 für die Titrationspunkte der STD-Titration.

Titrationspunkt	Set8 [μM]	RHRKVLRD [μM]
1.	1.87	39.1
2.	1.87	77.9
3.	1.86	116
4.	1.85	154
5.	1.84	192
6.	1.82	266
7.	1.80	339

9.7.3.2 STD-Artefakte des Peptids RHRKVLRD

Durch Zugabe von 21 μl einer 8.00 mM Lösung des Peptids RHRKVLRD wurden die maximale Ligandkonzentration der STD-Titration von 345 μM erhalten.

9.7.4.1 STD-Titration N-Acetyllactosamin in Anwesenheit der β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1

Die NMR-Experimente wurden in einem 3 mm-NMR-Röhrchen mit 180 μ l Pufferlösung aus 20 mM Tris-*d11* und 150 mM NaCl in D₂O durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit 35% DCl in D₂O auf 6.5 eingestellt. Die Konzentration von ST6Gal1 wurde auf 3 μ M eingestellt.

Die Messungen erfolgten mit dem Pulsprogramm *stdiffespg.3*. Das Pulsprogramm enthält neben den Sättigungspulsen einen *Spinlock* zur Unterdrückung der Proteinsignale sowie eine Sequenz zur Unterdrückung des Lösungsmittelsignals. Als Sättigungspuls dienten 50 ms *gauss1.1000*-Pulse mit einer Stärke von 40 dB und einer Gesamtsättigungszeit von 2 s. Im *off-resonance* Spektrum wurde für die Sättigungspulse ein Einstrahlpunkt von 40 ppm, im *on-resonance* Spektrum ein Einstrahlpunkt von -1 ppm gewählt. Es wurde ein TOCSY-Spinlock ($T_{1\rho}$ mit einer Feldstärke von 11.5 kHz, Dauer von 50 ms) verwendet. Die Messung erfolgte bei 300 K mit 1024 *Scans* und einem Relaxationsdelay von 2s.

Tabelle 25: Auflistung der Konzentrationen des *N*-Acetyllactosamins und der Sialyltransferase ST6Gal1 für die Titrationspunkte der STD-Titration

Titrationpunkt	ST6Gal1 [μ M]	LacNAc [μ M]
1.	3.0	93.4
2.	2.9	185
3.	2.9	318
4.	2.8	447
5.	2.8	634
6.	2.7	869

9.7.3.2 STD-Titration Cytidin-5'-monophosphat-Neuraminsäure in Anwesenheit der β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1

Die NMR-Experimente wurden in einem 3 mm-NMR-Röhrchen mit 180 μ l Pufferlösung aus 20 mM Tris-*d11* und 150 mM NaCl in D₂O durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit 35% DCl in D₂O auf 6.5 eingestellt. Die Konzentration von ST6Gal1 wurde auf 3 μ M eingestellt.

Die Messungen erfolgten mit dem Pulsprogramm *stdiffespg.3*. Das Pulsprogramm enthält neben den Sättigungspulsen einen *Spinlock* zur Unterdrückung der Proteinsignale sowie eine Sequenz zur Unterdrückung des Lösungsmittelsignals. Als Sättigungspuls dienten 50 ms *gauss1.1000*-Pulse mit einer Stärke von 40 dB und einer Gesamtsättigungszeit von 2 s. Im *off-resonance* Spektrum wurde für die Sättigungspulse ein Einstrahlpunkt von 40 ppm, im *on-resonance* Spektrum ein Einstrahlpunkt von -1 ppm gewählt. Es wurde ein TOCSY-Spinlock ($T_{1\rho}$ mit einer Feldstärke von 11.5 kHz, Dauer von 50 ms) verwendet. Die Messung erfolgte bei 300 K mit 1024 *Scans* und einem Relaxationsdelay von 2s.

Tabelle 26: Auflistung der Konzentrationen der Cytidin-5'-monophosphat-Neuraminsäure und der Sialyltransferase ST6Gal1 für die Titrationspunkte der STD-Titration

Titrationpunkt	ST6Gal1 [μ M]	CMP-Sia [μ M]
1.	3.0	20.9
2.	2.9	51.4
3.	2.9	80.9
4.	2.8	119
5.	2.8	160
6.	2.7	199

9.7.4 STD-Titrationsen verschiedener Kohlenhydratverbindungen auf Grundlage der Mannose in Anwesenheit des Lectins Concanavalin A

Alle NMR-Experimente wurden in einem 5 mm-NMR-Röhrchen mit 600 μ l Pufferlösung aus 50 mM NaOAc-*d*3, 1 mM MgCl und 1 mM CaCl₂ in D₂O durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit 35% DCl in D₂O auf 4.5 eingestellt. Die Konzentration von ConA wurde auf etwa 5 μ M eingestellt.

Die Messungen erfolgten mit dem Pulsprogram *stddiffespg.3*. Das Pulsprogram enthält neben den Sättigungspulsen einen *Spinlock* zur Unterdrückung der Proteinsignale sowie eine Sequenz zur Unterdrückung des Lösungsmittelsignals. Als Sättigungspuls dienten 50 ms *gauss1.1000*-Pulse mit einer Stärke von 20 dB und einer Gesamtsättigungszeit von 2 s. Im *off-resonance* Spektrum wurde für die Sättigungspulse ein Einstrahlpunkt von 66.7 ppm, im *on-resonance* Spektrum ein Einstrahlpunkt von -1 ppm gewählt. Es wurde ein TOCSY-Spinlock ($T_{1\rho}$ mit einer Feldstärke von 11.5 kHz, Dauer von 50 ms) verwendet. Die Messung erfolgte bei 300 K mit 1024 *Scans* und einem Relaxationsdelay von 2s.

9.7.4.1 STD-Titration von α -1-O-Methylmannosid

Durch Zugabe von 5 μ l einer 4.00 mM (1.-4. Titrationspunkt) bzw. 8.00 mM (5.-6. Titrationspunkt) Lösung α -1-O-Methylmannosids wurden die in Tabelle 27 aufgeführten Protein- und Ligandkonzentrationen erhalten.

Tabelle 27: Auflistung der Konzentrationen des α -1-O-Methylmannosids und des Lektins Concanavalin A für die Titrationspunkte der STD-Titration.

Titrationspunkt	ConA [μ M]	α -1-O-Methylmannosid [μ M]
1.	5.0	33.1
2.	4.9	65.6
3.	4.9	97.6
4.	4.8	129
5.	4.8	190
6.	4.7	250

9.7.4.2 STD-Titration Neoglycokonjugat A

Durch Zugabe von jeweils 5µl einer 4.00 mM (1.-3. Titrationspunkt) bzw. 8.00 mM (4.-7. Titrationspunkt) Lösung Neoglycokonjugat A wurden die in Tabelle 28 aufgeführten Protein- und Ligandkonzentrationen erhalten.

Tabelle 28: Auflistung der Konzentrationen des Neoglycokonjugat A und des Lektins Concanavalin A für die Titrationspunkte der STD-Titration.

Titrationspunkt	ConA [µM]	Neoglycokonjugat A [µM]
1.	5.0	33.1
2.	4.9	65.6
3.	4.8	129
4.	4.8	190
5.	4.7	313
6.	4.6	430
7.	4.6	545

9.7.4.3 STD-Titration Neoglycokonjugat B

Durch Zugabe von 5 μ l einer 4.00 mM (1.-5. Titrationspunkt) bzw. 8.00 mM (6.-7. Titrationspunkt) Lösung Neoglycokonjugat B wurden die in Tabelle 29 aufgeführten Protein- und Ligandkonzentrationen erhalten.

Tabelle 29: Auflistung der Konzentrationen des Neoglycokonjugat B und des Lektins Concanavalin A für die Titrationspunkte der STD-Titration.

Titrationspunkt	ConA [μ M]	Neoglycokonjugat B [μ M]
1.	5.0	33
2.	4.9	66
3.	4.9	98
4.	4.8	129
5.	4.8	160
6.	4.8	222
7.	4.7	283

9.8 Enzymkinetische Messungen

Alle NMR-Messungen wurden in wässriger Lösung durchgeführt. Die Puffersysteme wurden für jedes Protein abgestimmt. Die genaue Startkonzentration wurde nach dem Mischen der Protein- und Peptidlösung mittels einem *zgesgp* Experiments ermittelt. Die hier eingestellten Messparameter wurden für die Reaktionsverfolgung mittels des Pulsprogramms *zgesgp2D_4* übernommen. Dieses Pulsprogramm enthält einen *delay* Delta, der sich aus der eingestellten, gewünschten Differenz (D20) zwischen zwei zeitlichen Datenpunkten und der Akquisitionszeit für einen zeitlichen Datenpunkt ergibt. Im Gegensatz zum *zg2D*-Pulsprogramm der Firma Bruker ist der *delay* Delta der Akquisitionszeit nachgestellt. Das Pulsprogramm wurde von Alexander Stark zur Verfügung gestellt.

9.8.1.1 Umsetzung des Peptids RHRKVL durch die Methyltransferase Set8

Die Messung wurde mit einem Gesamtvolumen von 700 μ l durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit einer Pufferkonzentration von 50 mM Tris-*d11*, 50 mM NaCl, 2 mM NaN₃ und 350 μ M TMSP-*d4* bei pH = 8 angesetzt. Die Konzentration des Enzyms SET8 wurde auf 3.2 μ M eingestellt, die Konzentration des SAM auf 4.8 mM und die Konzentration des Peptids RHRKLV wurde aus der Konzentrationslösung als 218 μ M berechnet. Die Reaktion wurde in 15 min-Schritten verfolgt. Als Pulsprogramm wurde eine Variante des Pulsprogramms *zgesgp2D_4* mit 64 Scans verwendet. Die Messung erfolgte bei T = 310 K und wurde 6:01 Minuten nach Zugabe der SAM-Stammlösung gestartet. Die Gesamtdauer der Messung wurde auf 6 Stunden festgesetzt.

9.8.1.2 Umsetzung des Peptids RHKKVL in Anwesenheit des Inhibitors RHRAVL durch die Methyltransferase Set8

Die Messung wurde mit einem Gesamtvolumen von 700 μ l durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit einer Pufferkonzentration von 50 mM Tris-*d11*, 50 mM NaCl, 2 mM NaN₃ und 350 μ M TMSP-*d4* bei pH = 8 angesetzt. Die Konzentration des Enzyms SET8 wurde auf 3.2 μ M eingestellt, die Konzentration des SAM auf 4.8 mM und die Konzentrationen der Peptide RHRKLV (247 μ M) und RHRAVL (209 μ M) wurde aus der Konzentrationslösung berechnet. Die Reaktion wurde in 15 min-Schritten verfolgt. Als Pulsprogramm wurde eine Variante des Pulsprogramms *zgesgp2D_4* mit 64 Scans verwendet. Die Messung erfolgte bei

T = 310 K und wurde 5:04 Minuten nach Zugabe der SAM-Stammlösung gestartet. Die Gesamtdauer der Messung wurde auf 6 Stunden festgesetzt.

9.8.1.3 Umsetzung des Peptids RHRKVLRD durch die Methyltransferase Set8

Die Messung wurde mit einem Gesamtvolumen von 180 μ l durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit einer Pufferkonzentration von 50 mM Tris-*d11*, 50 mM NaCl, 2 mM NaN₃ und 100 μ M TMSP-*d4* bei pH = 8 angesetzt. Die Konzentration des Enzyms SET8 wurde auf 10.5 μ M eingestellt, die Konzentration des SAM auf 4.7 mM und die Konzentration des Peptids RHRKLVRD auf 350 μ M. Die Reaktion wurde in 6 min-Schritten verfolgt. Als Pulsprogramm wurde das Pulsprogramm *zgesgp2D_4* mit 48 Scans verwendet. Die Messung erfolgte bei T = 310 K und wurde 5:20 Minuten nach Zugabe der SAM-Stammlösung gestartet. Die Gesamtdauer der Messung wurde auf 5 Stunden festgesetzt.

9.8.1.4 Umsetzung des Peptids AKRHRKVLRD durch die Methyltransferase Set8

Die Messung wurde mit einem Gesamtvolumen von 180 μ l durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit einer Pufferkonzentration von 50 mM Tris-*d11*, 50 mM NaCl, 2 mM NaN₃ und 100 μ M TMSP-*d4* bei pH = 8 angesetzt. Die Konzentration des Enzyms SET8 wurde auf 10.5 μ M eingestellt, die Konzentration des SAM auf 4.7 mM und die Konzentration des Peptids RHRKLVRD auf 350 μ M. Die Reaktion wurde in 6 min-Schritten verfolgt. Als Pulsprogramm wurde das Pulsprogramm *zgesgp2D_4* mit 48 Scans verwendet. Die Messung erfolgte bei T = 310 K und wurde 6:23 Minuten nach Zugabe der SAM-Stammlösung gestartet. Die Gesamtdauer der Messung wurde auf 10 Stunden festgesetzt.

9.8.2 Umsetzung von *N*-acetyl-3-*O*- β -D-galactopyransoyl- β -D-galactosamin-methylglycosid durch die Fucosyltransferase2

Die Messung wurde mit einem Gesamtvolumen von 180 μ l an einem Bruker Avance I 700 MHz NMR-Spektrometer durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit einer Pufferkonzentration von 12.5 mM Tris-*d11* und 75 mM NaCl in D₂O mit pH = 7.0 angesetzt. Die Konzentration des Enzyms FUT2 wurde auf 1 μ M eingestellt, GDP-Fucose auf 750 μ M und die Konzentration von *N*-acetyl-3-*O*- β -D-galactopyransoyl- β -D-galactosamin-methylglycosid auf 250 μ M.

Ferner wurden 10 *Units* alkalische Phosphatase hinzugegeben. Die Reaktion wurde in 5 min-Schritten verfolgt. Als Pulsprogramm wurde eine Variante des Pulsprogramms *zgesgp2D_4* mit 64 Scans verwendet. Die Messung erfolgte bei $T = 310\text{ K}$ und wurde 6:23 Minuten nach Zugabe der GDP-Fucose gestartet. Die Gesamtdauer der Messung wurde auf 10 Tage festgesetzt.

9.8.3 Sialylierung von *N*-Acetyllactosamin durch die β -Galaktosid- α -1,6-sialyltransferase-1

Die Messung wurde mit einem Gesamtvolumen von 180 μl an einem Bruker Avance I 700 MHz NMR-Spektrometer durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit einer Pufferkonzentration von 20 mM Tris-*d11* und 150 mM NaCl in D_2O mit $\text{pH} = 6.5$ angesetzt. Die Konzentration des Enzyms ST6Gal1 wurde auf 0.5 μM eingestellt, *N*-Acetyllactosamin auf 225 μM und die Konzentration von CMP-Sia auf 375 μM . Ferner wurden 0.04 mg/ml CD73 hinzugegeben. Die Reaktion wurde in 6 min-Schritten verfolgt. Als Pulsprogramm wurde eine Variante des Pulsprogramms *zgesgp2D_4* mit 64 Scans verwendet. Die Messung erfolgte bei $T = 310\text{ K}$ und wurde 7:05 Minuten nach Zugabe der CMP-Sia-Stammlösung gestartet. Die Gesamtdauer der Messung wurde auf 10.5 Tage festgesetzt.

9.9 Toxikologische Daten

Tabelle 30: Sicherheitsdaten der verwendeten Chemikalien

Substanz	Gefahrenpiktogramme	H-Sätze	P-Sätze
α -1- <i>O</i> -Methylmannosid	-	-	-
3-(Trimethylsilyl)propion- 2,2,3,4- <i>d</i> 4-säure- Natriumsalz		315-319-335	261- 305+351+338
Aceton	 	225-329- EUH066-336	210- 305+351+338- 403+233
Acetonitril	 	225- 302+312+332- 319	210-280- 305+351+338- 403+235
Ameisensäure	 	314-335	261-280- 305+351+338- 310
Ampicillin	-	-	-
Calciumchlorid		319	264-280- 305+351+338
Deuteriumchlorid	 	314-335	261-280- 305+351+338- 310
Dichlormethan	 	315-319-335- 336-351-373	261-280- 305+351+338
Diethylether	 	224-302-336- EUH019-066	210-240- 403+235

Substanz	Gefahrenpiktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Essigsäureanhydrid		226-332-302- 314-335	280- 301+330+331- 305+351+338
Ethanol		225	210-233-240- 241-280
Fmoc-Aminosäure-Derivate	-	-	-
Isopropyl- β -D-thio- galactopyranosid	-	-	-
Imidazol		302-314-360D	201-280- 303+330+331- 305+351+338
Luria Broth	-	-	-
Magnesiumchlorid	-	-	-
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin		225-302-31- 318-335	210-261-280- 305+351+338- 331
<i>N,N</i> -Dimethylformamid		312+332-319- 360D	210-280-281- 305+351+338- 308+313
Natriumacetat- <i>d</i> 3	-	-	-
Natriumazid		EUH032-300- 410	264-273- 301+310-321- 330-391-405
Natriumchlorid	-	-	-

Substanz	Gefahrenpiktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Natriumdihydrogenphosphat	-	-	-
<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumborat		315-319-335	261- 305+351+338
Piperidin		225-311+331- 314	210-261-280- 303+361+353- 305+351+338- 370+378
Rink Amid Resin		315-319-335	261- 305+351+338
<i>S</i> -(5'-Adenosyl)- <i>L</i> -methioninchlorid	-	-	-
(<i>tert</i> -Butyl)methylether		225-315	210-233-240- 280-302+352
Trifluoressigsäure		314-332-412	261-273-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Triisopropylsilan		319-335-315- 226	261- 305+351+338
Tris(hydroxymethyl)amino- methan		315-319-335	261-264-280- 302+352
Tris(hydroxymethyl- <i>d</i> 3)amino- <i>d</i> 2-methan		315-319-335	261-264-280- 302+352

10 Literaturverzeichnis

1. Voet, D., Voet, J. G., and Pratt, C. (2010) *Lehrbuch der Biochemie*, 2te ed., WILEY-VCH, Weinheim
2. Purich, D. L. (2010) *Enzyme Kinetics Catalysis & Control: A Reference of Theory and Best-Practice Methods*, Elsevier, London
3. Michaelis, L., and Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertwirkung. *Biochem.Z.*, 333-369
4. Briggs, G. E., and Haldane, J. B. S. (1925) A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.*, 338-339
5. Vandenberg, J. I., Kuchel, P. W., and King, G. K. (1986) Application of progress curve analysis to in situ enzyme kinetics using ¹H NMR spectroscopy. *Analytical Biochemistry* **155**, 38-44
6. Morris, G. A., and Emsley, J. W. (2010) *Encyclopedia of Magnetic Resonance: Multidimensional NMR-Methods for the Solution State*, Wiley, Chichester
7. Schulze-Sünninghausen, D., Becker, J., and Luy, B. (2014) Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural Abundance. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 1242-1245
8. Schulze-Sünninghausen, D., Becker, J., Koos, M. R. M., and Luy, B. (2017) Improvements, extensions, and practical aspects of rapid ASAP-HSQC and ALSOFAST-HSQC pulse sequences for studying small molecules at natural abundance. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **281**, 151-161
9. Schnell, S., and Mendoza, C. (1997) A closed-form solution for time-dependent enzyme kinetics. *Journal of Theoretical Biology*, 207-212
10. Duggleby, R. G. (1995) Analysis of enzyme progress curves by nonlinear regression. *Methods Enzymol.*, 61-90
11. Lambertsche W-Funktion.
12. Helfgott, M., and Seier, E. (2007) Some Mathematical and Statistical Aspects of Enzyme Kinetics. *Journal of Online Mathematics and Its Applications* **7**, 1-34
13. Straathof, A. J. (2001) Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 991-998
14. Corless, R. M., Gonnet, G. H., Hare, D. E. G., Jeffrey, D. J., and Knuth, D. E. (1996) On the LambertW function. *Advances in Computational Mathematics* **5**, 329-359
15. Goudar, C. T., Sonnad, J. R., and Duggleby, R. G. (1999) Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation. *Biochim Biophys Acta* **1429**, 377-383
16. Goudar, C. T., Harris, S. K., McInerney, M. J., and Suflita, J. M. (2004) Progress curve analysis for enzyme and microbial kinetic reactions using explicit solutions based on the Lambert W function. *Journal of microbiological methods* **59**, 317-326
17. Bruice, P. Y. (2011) *Organische Chemie*, 5. Auflage ed., München
18. Merrifield, R. (1965) Solid-Phase Peptide Synthesis. *Endeavour*, 3-7
19. Mayer, M., and Meyer, B. (1999) Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 1784-1788
20. Meyer, B., and Peters, T. (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 6108-6117
21. Mayer, M., and Meyer, B. (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.*, 6108-6117
22. Hackl, T. (2009) *Dissertation Universität Hamburg*,
23. Jayalakshmi, V., and Krishna, N. R. (2002) Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J. Magn. Reson.*, 106-118
24. Claridge, T. D. W. (2009) *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2nd ed., Elsevier Ltd., Amsterdam, Netherlands

25. Ludwig, C. (1856) *Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösung*, Aus der K.K. Hof- und Staatsdruckerei, in Commission bei W. Braumüller, Buchhändler des K.K. Hofes und der K. Akademie der Wissenschaften, Wien
26. Jr., A. H. E., and Drickamer, H. G. (1955) Thermal Diffusion in Polymer Solutions. *The Journal of Chemical Physics* **23**, 2252-2257
27. Ham, J. S. (1960) Kinetic Theory of Thermal Diffusion in Dilute Polymer Solutions. *Journal of Applied Physics* **31**, 1853-1858
28. Morozov, K. I. (1999) Thermal diffusion in disperse systems. *Journal of Experimental and Theoretical Physics* **88**, 944-946
29. Schimpf, M. E., and Semenov, S. N. (2000) Mechanism of Polymer Thermophoresis in Nonaqueous Solvents. *The Journal of Physical Chemistry B* **104**, 9935-9942
30. Voit, A., Krekhov, A., Enge, W., Kramer, L., and Köhler, W. (2005) Thermal Patterning of a Critical Polymer Blend. *Physical Review Letters* **94**, 214501
31. Duhr, S., and Braun, D. (2006) Thermophoretic Depletion Follows Boltzmann Distribution. *Physical Review Letters* **96**, 168301
32. Dhont, J. K., Wiegand, S., Duhr, S., and Braun, D. (2007) Thermodiffusion of charged colloids: single-particle diffusion. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **23**, 1674-1683
33. Groot, S. R. d., and Mazur, P. (1969) *Non-equilibrium thermodynamics*, North-Holland Pub. Co.; Interscience Publishers, Amsterdam
34. Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and drug development technologies* **9**, 342-353
35. Duhr, S., and Braun, D. (2006) Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 19678-19682
36. Baaske, P., Wienken, C. J., Reineck, P., Duhr, S., and Braun, D. (2010) Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **49**, 2238-2241
37. Kornberg, R. (1974) Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*, 868-871
38. Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Biol.*, 172-183
39. Ill, R. J. S., Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003) Histone lysine methylation: A signature for chromatin function. *Trends Genet.*, 629-639
40. Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004) Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* **14**, 183 - 193
41. Fang, J., and al, Q. F. e. (2002) Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr. Biol.*, 1086-1099
42. Tsunaka, Y., Kajimura, N., Tate, S., and Morikawa, K. (2005) Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle. *Nucleic Acids Research* **33**, 3424-3434
43. Rice, J. C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D., and Allis, C. D. (2002) Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes & Dev.*, 2225-2230
44. Trievel, R. (2004) Structure and function of histone methyltransferases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**, 147 - 169
45. Nishioka, K., and al, J. C. R. e. (2002) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of the histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. cell*, 1201-1213

46. Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., and Steward, R. (2005) PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev* **19**, 431 - 435
47. Julien, E., and Herr, W. (2004) A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. *Mol. Cell*, 713-725
48. Couture, J.-F., Collazo, E., Brunzelle, J. S., and Trievel, R. C. (2005) Structure and functional analysis of SET8, a histone H4 Lys-20 methyltransferase. *Genes & Dev.*, 1455-1465
49. Foelsing, M. (2013) Diplomarbeit, Universität Hamburg.
50. Exnowitz, F., Meyer, B., and Hackl, T. (2012) NMR for direct determination of Km and Vmax of enzyme reactions based on the Lambert W function-analysis of progress curves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1824**, 443-449
51. Miyoshi, E., Moriwaki, K., Terao, N., Tan, C. C., Terao, M., Nakagawa, T., Matsumoto, H., Shinzaki, S., and Kamada, Y. (2012) Fucosylation is a promising target for cancer diagnosis and therapy. *Biomolecules* **2**, 34-45
52. Goettig, P. (2016) Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *Int J Mol Sci* **17**, 1969
53. Ho, W. L., Hsu, W. M., Huang, M. C., Kadomatsu, K., and Nakagawara, A. (2016) Protein glycosylation in cancers and its potential therapeutic applications in neuroblastoma. *Journal of hematology & oncology* **9**, 100
54. Giovampaola, C. D., Capone, A., Nolfi, D., and Rosati, F. (2016) Alpha (1,2) Fucosylated Glycoepitopes from Invertebrates to Humans. *Research & Reviews: Journal of Zoological Sciences* **4**, 42
55. Becker, D. J., and Lowe, J. B. (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* **13**, 41r-53r
56. Dube, D. H., and Bertozzi, C. R. (2005) Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nature reviews. Drug discovery* **4**, 477-488
57. de Vries, T., Knegtel, R. M., Holmes, E. H., and Macher, B. A. (2001) Fucosyltransferases: structure/function studies. *Glycobiology* **11**, 119r-128r
58. Ma, B., Simala-Grant, J. L., and Taylor, D. E. (2006) Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* **16**, 158R-184R
59. Javaud, C., Dupuy, F., Maftah, A., Julien, R., and Petit, J. M. (2003) The fucosyltransferase gene family: an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution. *Genetica* **118**, 157-170
60. Moriwaki, K., and Miyoshi, E. (2010) Fucosylation and gastrointestinal cancer. *World J Hepatol* **2**, 151-161
61. Pinho, S. S., and Reis, C. A. (2015) Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature reviews. Cancer* **15**, 540-555
62. Okeley, N. M., Alley, S. C., Anderson, M. E., Boursalian, T. E., Burke, P. J., Emmerton, K. M., Jeffrey, S. C., Klussman, K., Law, C.-L., Sussman, D., Toki, B. E., Westendorf, L., Zeng, W., Zhang, X., Benjamin, D. R., and Senter, P. D. (2013) Development of orally active inhibitors of protein and cellular fucosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 5404-5409
63. Merino, P., Tejero, T., Delso, I., Hurtado-Guerrero, R., Gomez-SanJuan, A., and Sadaba, D. (2012) Recent progress on fucosyltransferase inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry* **12**, 1455-1464
64. Tu, Z., Lin, Y.-N., and Lin, C.-H. (2013) Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors. *Chemical Society Reviews* **42**, 4459-4475
65. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* **98**, 10089-10092
66. Coughtrie, D. J., and Tew, D. P. (2014) The Nosé–Hoover looped chain thermostat for low temperature thawed Gaussian wave-packet dynamics. *The Journal of Chemical Physics* **140**, 194106

67. Martyna, G. J., Tobias, D. J., and Klein, M. L. (1994) Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics* **101**, 4177-4189
68. M.P.Kötzler. (2012) *Mechanism and Inhibition of Fucosyltransferases*. Dr. rer. nat., University of Hamburg
69. Rillahan, C. D., Antonopoulos, A., Lefort, C. T., Sonon, R., Azadi, P., Ley, K., Dell, A., Haslam, S. M., and Paulson, J. C. (2012) Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nat Chem Biol* **8**, 661-668
70. Mancheño, J. M., Tateno, H., Goldstein, I. J., Martínez-Ripoll, M., and Hermoso, J. A. (2005) Structural Analysis of the *Laetiporus sulphureus* Hemolytic Pore-forming Lectin in Complex with Sugars. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 17251-17259
71. Lira-Navarrete, E., Valero-González, J., Villanueva, R., Martínez-Júlvez, M., Tejero, T., Merino, P., Panjikar, S., and Hurtado-Guerrero, R. (2011) Structural Insights into the Mechanism of Protein O-Fucosylation. *PLOS ONE* **6**, e25365
72. Shivakumar, D., Williams, J., Wu, Y., Damm, W., Shelley, J., and Sherman, W. (2010) Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation* **6**, 1509-1519
73. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., and Tirado-Rives, J. (1996) Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 11225-11236
74. Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., Wang, L., Lupyan, D., Dahlgren, M. K., Knight, J. L., Kaus, J. W., Cerutti, D. S., Krilov, G., Jorgensen, W. L., Abel, R., and Friesner, R. A. (2016) OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation* **12**, 281-296
75. Sarnesto, A., Köhlin, T., Hindsgaul, O., Thurin, J., and Blaszczyk-Thurin, M. (1992) Purification of the secretor-type beta-galactoside alpha 1----2-fucosyltransferase from human serum. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 2737-2744
76. Krogan, N., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M., Dean, K., Ryan, O., Golshani, A., and Johnston, M. (2003) The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell* **11**, 721 - 729
77. Her, C., Alonzo, A. P., Vang, J. Y., Torres, E., and Krishnan, V. V. (2015) Real-Time Enzyme Kinetics by Quantitative NMR Spectroscopy and Determination of the Michaelis–Menten Constant Using the Lambert-W Function. *Journal of Chemical Education* **92**, 1943-1948
78. Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S., and Delannoy, P. (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie* **83**, 727-737
79. Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., Delannoy, P., and Oriol, R. (2005) The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* **15**, 805-817
80. Chen, X., and Varki, A. (2010) Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS chemical biology* **5**, 163-176
81. Hennes, T., Chui, D., Paulson, J. C., and Marth, J. D. (1998) Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4504-4509
82. Arndt, N. X., Tiralongo, J., Madge, P. D., von Itzstein, M., and Day, C. J. (2011) Differential carbohydrate binding and cell surface glycosylation of human cancer cell lines. *Journal of cellular biochemistry* **112**, 2230-2240
83. Wu, D., Huang, W., Wang, Y., Guan, W., Li, R., Yang, Z., and Zhong, N. (2014) Gene silencing of beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1 inhibits human influenza virus infection of airway epithelial cells. *BMC microbiology* **14**, 78

84. Dall'Olio, F., Malagolini, N., Trinchera, M., and Chiricolo, M. (2014) Sialosignaling: sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 2752-2764
85. Swindall, A. F., and Bellis, S. L. (2011) Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **286**, 22982-22990
86. Lee, M., Lee, H.-J., Bae, S., and Lee, Y.-S. (2008) Protein Sialylation by Sialyltransferase Involves Radiation Resistance. *Molecular Cancer Research* **6**, 1316-1325
87. Dalziel, M., Dall'Olio, F., Mungul, A., Piller, V., and Piller, F. (2004) Ras oncogene induces β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) via a RaIGEF-mediated signal to its housekeeping promoter. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3623-3634
88. Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U., and Paulson, J. C. (1982) Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. Enzymatic characterization of a Gal beta 1 to 3(4)GlcNAc alpha 2 to 3 sialyltransferase and a Gal beta 1 to 4GlcNAc alpha 2 to 6 sialyltransferase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 13845-13853
89. Krezdorn, C. H., Kleene, R. B., Watzel, M., Ivanov, S. X., Hokke, C. H., Kamerling, J. P., and Berger, E. G. (1994) Human β 1,4 galactosyltransferase and α 2,6 sialyltransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* are retained as active enzymes in the endoplasmic reticulum. *European Journal of Biochemistry* **220**, 809-817
90. Malissard, M., Zeng, S., and Berger, E. G. (2000) Expression of Functional Soluble Forms of Human β -1,4-Galactosyltransferase I, α -2,6-Sialyltransferase, and α -1,3-Fucosyltransferase VI in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **267**, 169-173
91. Paulson, J. C., Rearick, J. I., and Hill, R. L. (1977) Enzymatic properties of beta-D-galactoside alpha2 leads to 6 sialyltransferase from bovine colostrum. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 2363-2371
92. Kuhn, B., Benz, J., Greif, M., Engel, A. M., Sobek, H., and Rudolph, M. G. (2013) The structure of human alpha-2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **69**, 1826-1838
93. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., and Sherman, W. (2013) Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **27**, 221-234
94. Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., and Sherman, W. (2013) Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des* **27**, 221-234
95. Banks, J. L., Beard, H. S., Cao, Y., Cho, A. E., Damm, W., Farid, R., Felts, A. K., Halgren, T. A., Mainz, D. T., Maple, J. R., Murphy, R., Philipp, D. M., Repasky, M. P., Zhang, L. Y., Berne, B. J., Friesner, R. A., Gallicchio, E., and Levy, R. M. (2005) Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *Journal of computational chemistry* **26**, 1752-1780
96. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., and Shenkin, P. S. (2004) Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 1739-1749
97. Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., and Banks, J. L. (2004) Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 1750-1759
98. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., and Mainz, D. T. (2006) Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 6177-6196

99. Guo, Z., Mohanty, U., Noehre, J., Sawyer, T. K., Sherman, W., and Krilov, G. (2010) Probing the α -Helical Structural Stability of Stapled p53 Peptides: Molecular Dynamics Simulations and Analysis. *Chemical Biology & Drug Design* **75**, 348-359
100. Polak, E., and Ribiere, G. (1969) Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées. *R.I.R.O.* **3**, 35-43
101. Bowers KJ, C. E., Xu H, Dror RO, Eastwood MP, Gregersen BA, Klepeis JL, Kolossváry I, Moraes MA, Sacerdoti FD, Salmon JK, Shan Y, Shaw DE. (2006) Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. *Proceedings of the ACM/IEEE conference on supercomputing (SC06), Tampa, Florida, November 11–17*
102. Fasting, C., Schalley, C. A., Weber, M., Seitz, O., Hecht, S., Kokschi, B., Dervede, J., Graf, C., Knapp, E. W., and Haag, R. (2012) Multivalency as a chemical organization and action principle. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **51**, 10472-10498
103. Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130
104. Haltiwanger, R. S., and Lowe, J. B. (2004) Role of glycosylation in development. *Annual review of biochemistry* **73**, 491-537
105. Ernst, B., and Magnani, J. L. (2009) From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 661-677
106. Weis, W. I. (1997) Cell-surface carbohydrate recognition by animal and viral lectins. *Current opinion in structural biology* **7**, 624-630
107. Mager, M. D., LaPointe, V., and Stevens, M. M. (2011) Exploring and exploiting chemistry at the cell surface. *Nature chemistry* **3**, 582-589
108. Mammen, M., Choi, S.-K., and Whitesides, G. M. (1998) Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **37**, 2754-2794
109. Cecioni, S., Faure, S., Darbost, U., Bonnamour, I., Parrot-Lopez, H., Roy, O., Taillefumier, C., Wimmerová, M., Praly, J.-P., Imberty, A., and Vidal, S. (2011) Selectivity among Two Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of “Clicked” Multivalent Glycoclusters. *Chemistry – A European Journal* **17**, 2146-2159
110. Smith, E. A., Thomas, W. D., Kiessling, L. L., and Corn, R. M. (2003) Surface Plasmon Resonance Imaging Studies of Protein-Carbohydrate Interactions. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 6140-6148
111. Kussrow, A., Kaltgrad, E., Wolfenden, M. L., Cloninger, M. J., Finn, M. G., and Bornhop, D. J. (2009) Measurement of Mono- and Polyvalent Carbohydrate-Lectin Binding by Back-Scattering Interferometry. *Analytical chemistry* **81**, 4889-4897
112. Ortiz Mellet, C., Defaye, J., and García Fernández, J. M. (2002) Multivalent Cyclooligosaccharides: Versatile Carbohydrate Clusters with Dual Role as Molecular Receptors and Lectin Ligands. *Chemistry – A European Journal* **8**, 1982-1990
113. Fleck, C. (2015) Dissertation - Synthese und Evaluierung von Glykokonjugaten auf Basis von Adamantan.
114. Mandal, D. K., Kishore, N., and Brewer, C. F. (1994) Thermodynamics of Lectin-Carbohydrate Interactions. Titration Microcalorimetry Measurements of the Binding of N-Linked Carbohydrates and Ovalbumin to Concanavalin A. *Biochemistry* **33**, 1149-1156
115. Munoz, E. M., Correa, J., Fernandez-Megia, E., and Riguera, R. (2009) Probing the Relevance of Lectin Clustering for the Reliable Evaluation of Multivalent Carbohydrate Recognition. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 17765-17767
116. Memmel, E. (2015) Dissertation Universität Würzburg.
117. Kleer, C., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S., Ghosh, D., Sewalt, R., Otte, A., and Hayes, D. (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11606 - 11611

11 Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Familie für die Unterstützung, die sie mir in all die Jahre gegen haben, bedanken.

Dem AK-Meyer danke ich für die schöne Zeit. Alena, Tim und Jan-Mirko für viele Diskussionen und die Arbeit erleichternde Tätigkeiten. Brigitte für die nette Aufnahme im Labor und viele Gespräche. Ilona und Brita für viele interessante Mittagspausen und nette Unterhaltungen. Max danke ich für die vielen Diskussionen und Gespräche. Carsten und Melissa für Tipps und Tricks rund um die HPLC. Wei danke ich für die vielen ruhigen Gespräche abseits des lauten Alltags.

Der Massen-Abteilung danke ich für die Messung unzähliger Proben. Dem IT-Service für Rat und Hilfe bei diversen Problemen.

12 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

M. Fölsing

Hamburg, den 27.1.2023