

Abschlussbericht

Anschubprojekt: „P-ChemBind“

Förderkennzeichen:	? [leider nicht bekannt]
Zuwendungsempfänger:	Dr. Jan von Langermann
Kooperationspartner:	Dr. Thomas Werner Prof. Dr. Udo Kragl
Vorhabensbezeichnung:	„P-ChemBind“
Laufzeit des Vorhabens:	01.11.2019 - 31.12.2019
Autor:	Dr. Jan von Langermann

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung (ggf. offene Forschungsfragen)	3
2 Einleitung und Ziele des Projektes	3
3 Material und Methoden	4
4 Ergebnisse und Diskussion	4
5 weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt	7
6 Literaturverzeichnis	7

1. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

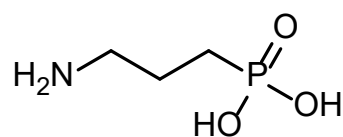
Das Ziel des Seed-Projektes „P-ChemBind“ war die Entwicklung einer effizienten „short-cut-method“ für die Anbindung von P-basierten Seitenketten an Proteine. In der Summe wurde festgestellt, dass die hier benötigten anspruchsvolleren Reaktionsbedingungen nahezu komplett in direkter Weise eine Denaturierung bzw. unerwünschte Veränderung des Proteins ergeben. Die Zielverbindung konnte nur in geringen Ausbeuten erzeugt werden.

Als Schlussfolgerung ergibt sich aus diesem Kurzprojekte, dass die angedachte Methode experimentell nicht erfolgsversprechend ist und die leider langwierigere Alternativroute, welche auch Teil der Promotionsarbeit von Frau Constanza Terazzi im P-Campus ist, gewählt werden muss (siehe Forschungsvorhaben III.2).

2. Einleitung und Ziele des Projektes

Die Anbindung von Seitenketten an Protein, in diesem Forschungsgebiet insbesondere P-basierten Verbindungen, ist ein mehrstufiger chemischer Prozess und birgt immer die Gefahr der Denaturierung des Proteins durch die harschen Reaktionsbedingungen. Dieser Umstand tritt analog bei der Immobilisierung von Enzymen/Proteinen an festen Oberflächen auf und ist die Basis für die Entwicklung vieler verschiedener Techniken zur Oberflächen- bzw. Einschlussimmobilisierung.^[1]

In der vorliegenden Forschungsarbeit erfolgten die Untersuchungen anhand des Rinderserumalbumins (BSA, bovine serum albumin), welches in dieser Kurzstudie als einfaches, und vor allem kostengünstiges, Modellprotein fungierte.^[2] Als P-basierte Komponente (zur Anbindung) wurde bereits im Vorfeld 3-Aminopropylphosphonsäure identifiziert, welche auf Grund der endständigen Aminogruppe als einen hinreichend weit entfernten N-basierten Ankerpunkt beinhaltet. Die Phosphonsäure-Komponenten stellt in diesem Fall ‚nur‘ einen Platzhalter dar (Schema 1).^[3]



Schema 1: 3-Aminopropylphosphonsäure

Das Ziel des Projektes war die Entwicklung einer einfacheren Alternative gegenüber etablierten, aber komplexeren, Verknüpfungsmethoden. Angriffspunkt am Protein sind N-basierte Seitenketten (ebenso NH_2), welche über einen Quervernetzer mit der Aminopropylphosphonsäure verbunden werden.

3. Material und Methoden

Alle Lösungsmittel und Reaktanden wurden von kommerziellen Produzenten bezogen und verwendet wie erhalten. Reinwasser wurde mit dem Ultra Clear Reinstwassersystem von SG Water (nun Evoqua, Günzburg) hergestellt. Die Gelelektrophore wurde mit 4-12% Bis-Tris polyacrylamide gel von Novex Life Technologies (bezogen von Thermo Fisher Scientific) mit einer Spannung von 150 V durchgeführt. "SeeBlue Pre-Stained Standard" wurde als Referenz verwendet und zum Färben wurde "SimplyBlue SafeStain" eingesetzt.

Zum Quervernetzen wurde Glutardialdehyd eingesetzt und die Methodiken aus dem Bereich der Oberflächenimmobilisierung und des vereinfachten Crosslinkens übernommen (vgl. crosslinked enzyme aggregates).

Alle Experimente wurden unter Normaldruck und Raumtemperatur im 1-5 mL Reaktionsmaßstab durchgeführt. Für Beispielreaktionen mit wässrigen Reaktionsmedien wurde 50 mM TRIS-Puffer pH 7.5 eingesetzt. Reaktionen mit organischen Reaktionsmedien wurden sowohl rein als auch mit Puffer gesättigt eingesetzt (sofern möglich), um eine ausreichende Stabilität des Proteins zu ermöglichen.

NMR-Messungen wurden mit einem BRUKER AVANCE 250, 300 oder 500 MHz NMR-Spektrometer am Institut für Chemie aufgenommen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Das Modellprotein wurde BSA und als P-basierter „Anker“ Aminopropylphosphonsäure ausgewählt (siehe oben). Über einen Linker war geplant den P-basierten „Anker“ an endständige NH_2 -Gruppen des Proteins anzubinden; insbesondere Lysin (Abbildung 1). Durch die Präsenz mehrerer NH_2 -Funktionalitäten ist mit dem Auftreten mehrerer Anknüpfungen am BSA-Protein zu rechnen.

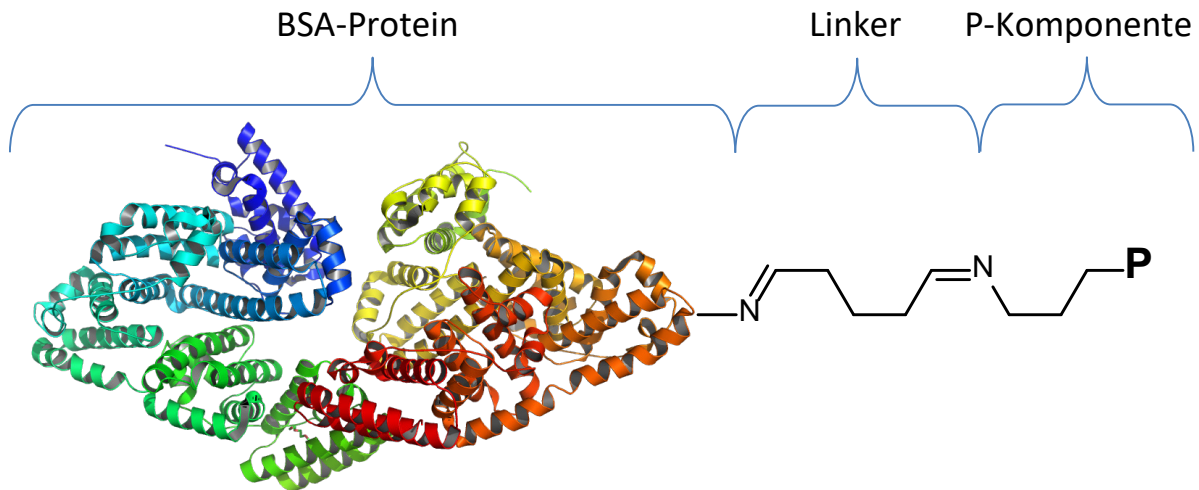


Abbildung 1: Darstellung des BSA-Proteins in Verbindung mit dem Spacer und 3-Aminopropylphosphonsäure

Die Ergebnisse zeigten leider sehr deutlich, dass der angestrebte Syntheseweg äußerst komplex und leider auch in vielen Fällen nur schwerlich reproduzierbar ist, d.h. wahrscheinlich einer sehr starken kinetischen Komponente unterworfen ist. In der Summe traten folgende Probleme bzw. unerwünschte Nebenreaktionen auf, welche die Produktbildung erschwerten:

a) Bildung von Enzymaggregaten (Quervernetzung)

Wie erwartet gab es eine begrenzte Bildung von Proteinaggregaten, welche durch die direkte Verknüpfung von einzelnen Proteinmolekülen erhalten werden, da der Quervernetzer selbstverständlich ebenso die Reaktion die Reaktion mit anderen Lysin-Seitenketten ermöglichte. Die Bildung von Enzymaggregaten schritt hierbei bis zu Proteinpräzipitaten fort, welche als weißlich-grauer Niederschlag erhalten wurden. Entsprechend dieses Verhalten beinhalten die Präzipitate leider nur eine geringe Menge Phosphor-Bestandteile, was im Laufe der Forschungsarbeiten versucht wurde zu erhöhen, aber nicht gelang (siehe auch c), unten). Dieser Umstand ist dabei gleichzeitig als zusätzlicher Fehlschlag anzusehen, da auch eine gefällte Proteinform potentiell als P-basierte Basis eingesetzt werden könnte. In diesem Fall wäre das Protein als heterogenisierte Form eines (Bio)Katalysators in einem organischen Lösungsmittel eingesetzt werden müssen, was für crosslinked enzyme aggregates (CLEA) für verschiedenste Enzyme schon erfolgreich gezeigt werden konnte.^[4] Der Umstand, der die Vernetzung verhinderte wurde auf Grund der Kürze des Forschungsvorhabens ungünstigerweise nie vollständig aufgeklärt.

b) Verlust der Proteinfaltung (nicht bestätigt)

Im Zuge der Untersuchungen bereits ohne den Einsatz des Crosslinkers, aber mit geringen Mengen von 3-Aminopropylphosphonsäure (< 25 mM), bei längeren Reaktionszeiten (>5 h) eine zusätzliche unerwünschte Fällung bzw. Veränderung des Proteins beobachtet. Dies deutete auf eine nicht eindeutig geklärte Reaktion der P-Verbindung mit dem Protein hin, welche wiederum die oben angedeutete Proteinstruktur zerstört und sich wahrscheinlich in einer Entfaltung des Proteins manifestiert. Dies wurde durch Gelelektrophorese (im Rahmen der Meßgenauigkeit) bestätigt, da sich keine Veränderung der Proteingröße beobachten ließ.

Nähere Untersuchungen zeigten auf, dass die unbekannt Reaktion aber keinen Einbau von Phosphor im Protein ergab (bestimmt via NMR), was auf das Ausbleiben einer stabilen, kovalenten Bindung hindeutet. Stattdessen scheint eine reduktive Bindungsbildung bzw. gleichzeitiger -spaltung (innerhalb des Proteins) mit einer simultanen Oxidation der Phosphorverbindung einzutreten und so die Proteinstruktur zu zerstören. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde in weiterführenden Experimenten versucht einen signifikanten Einbau von Phosphor innerhalb dieser Präzipitate zu erhalten, was aber nicht erfolgreich war und auf die oben genannte Redoxreaktion hindeutet. Die Details zur Proteinveränderungen wurde innerhalb des Projektrahmens nicht weiter untersucht, da die Erfolgswahrscheinlichkeit als zu gering angesehen wurde.

C) geringe Anbindung der P-Komponente

Basierend auf den Ergebnissen der Teile a) und b) konnte die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass eine geringe Anbindung der P-Komponente erfolgreich war. Dabei traten selbstverständlich die oben beschriebenen Parallel- bzw. Nebenreaktionen auf, welche die Gesamtausbeute verringern. Detailuntersuchungen ergaben, dass in vielen Fällen die Ergebnisse nur schwerlich reproduzierbar sind, was erneut auf die Vielzahl von Reaktionswegen hindeuten.

Nach einer (relativ kurzen) Optimierung konnte ca. 10% des verbleibenden nicht abreagierten BSA-Proteins mit P-basierten Ankerverbindungen beladen werden (basierend auf einer Schätzung via NMR). Die Aufreinigung des Proteins neben

den ganzen Nebenprodukten bzw. Proteinaggregaten erwies sich zudem als außerordentlich anspruchsvoll und bis zum Abschluss des Forschungsprojektes konnte keine effiziente Methode gefunden werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

In der Summe konnte gezeigt werden, daß der untersuchte Syntheseweg zwar grundlegend möglich ist, aber dabei eine Vielzahl von unerwünschten Nebenreaktionen auftreten. Dies führt zu einer großen Anzahl unterschiedlicher Reaktionskinetiken und schlussendlich zu einer schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, gepaart mit einer sehr geringen Ausbeute der gewünschten Zielverbindung. Neben der (erwarteten) Quervernetzung der Proteine untereinander scheint die chemische Art der P-basierte Verbindung einen entscheidenden Einfluss auf die Bindungskapazität und insbesondere Nebenreaktionen zu haben.

Aus den oben genannten Ergebnissen konnten wichtige Schlüsse bzgl. der geplanten Untersuchungen zu bi-funktionellen Katalysatoren gezogen werden. Zusammenfassend kann dargelegt werden, daß die angedachte „short-cut-Methode“ leider keine praktikable Lösung ist.

5. weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt

Grundlegend konnte mit diesem Anschubprojekt das Hauptprojekt III.2 innerhalb des P-Campus inhaltlich unterstützt werden, da der hier untersuchte Reaktionsweg ausgeschlossen wurde.

6. Literaturverzeichnis

- [1] a) S. Schmidt, K. Castiglione, R. Kourist, *Chemistry* **2018**, *24*, 1755–1768; b) D. Uhrich, J. von Langermann, *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 2111; c) D. Uhrich, H.-Y. Jang, J.-B. Park, J. von Langermann, *Journal of Biotechnology* **2019**, *289*, 31–38.
- [2] A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, R. Des Richardson, *Frontiers in physiology* **2014**, *5*, 299.

- [3] L. Longwitz, T. Werner, *Pure and Applied Chemistry* **2019**, *91*, 95–102.
- [4] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *RSC Adv* **2014**, *4*, 1583–1600.