

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Entwicklung und Anwendung eines neuartigen Festphasen-
Assays für die Untersuchung des enzymatischen Abbaus von
trägerfixierten Peptiden“

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marc Hovestädt

aus Neuss

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract (deutsch)	4
Abstract (englisch).....	6
1. Einleitung	7
2. Methodik	9
Auswahl der Oberflächen.....	10
Oberflächenfunktionalisierung.....	10
Peptidanbindung	10
Oberflächencharakterisierung	11
Proteasomaler Verdau	11
3. Ergebnisse.....	12
Oberflächencharakterisierung	12
Verdau trägerfixierter Peptide durch das 20S Proteasom.....	13
4. Diskussion	15
5. Literaturverzeichnis.....	18
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	20
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen.....	22
Lebenslauf	47
Publikationsliste	50
Eidesstattliche Versicherung	51
Danksagung	52

„Entwicklung und Anwendung eines neuartigen Festphasen-Assays für die Untersuchung des enzymatischen Abbaus von trägerfixierten Peptiden“

Marc Hovestädt

Zusammenfassung

Abstract (deutsch)

Proteasome sind zelluläre Proteasen, involviert in den Abbau von einer Vielzahl zellulärer Proteine. Das 20S Proteasom ist ein zylindrischer 28-mer Protein-Komplex, welcher aus zwei außenständigen sieben-Ringen (α -Ringe; Substrateingang) und zwei innenliegenden sieben-Ringen (β -Ringe; katalytisches Zentrum) besteht. Zahlreiche Studien haben den Beweis erbracht, dass das 20S Proteasom Peptide in verschiedenen Längen sowie komplette denaturierte Polypeptidketten abbaut. Jedoch konnte bis jetzt nicht der Beweis erbracht werden, dass das 20S Proteasom fähig ist, ein oberflächengebundenes, immobilisiertes Peptid zu prozessieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die erstmalig den proteasomalen Verdau trägerfixierter Peptide über den massenspektrometrischen Nachweis in Lösung gegangener Peptidfragmente charakterisiert. Initial wurden unterschiedliche Träger (Gold, Silizium und *glass-beads*) getestet und neuartige Funktionalisierungsmethoden für eine optimale Peptidanbindung etabliert. Hierbei wurde jede Funktionalisierungsstufe mittels verschiedener optischer und elektrochemischer Verfahren charakterisiert. Schließlich wurde der proteolytische Verdau der kovalent fixierten Peptide mittels LC-MS/MS analysiert und kartographiert. Während der Methodenentwicklung zeigte sich, dass die *glass-beads* aufgrund der signifikant geringer einzusetzenden Peptidmenge und der resultierenden absoluten Peptidstoffmenge am besten geeignet sind. Mit diesem optimierten Versuchsaufbau konnte erstmalig das Abbauverhalten verschiedener fixierter Peptide durch das Proteasom mittels nanoLC-MS/MS nachgewiesen werden.

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass das Proteasom N-Terminal fixierte Substrate mit einer erheblich beschleunigten Abbaurate prozessieren kann im Vergleich zum gelösten Substrat. Des Weiteren konnte ein verändertes Schnittmuster im

Vergleich zum gelösten Substrat beobachtet werden, das jedoch teilweise mit dem bekannten, in Lösung verdauten Substrats, übereinstimmt.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass auch die in den Lösungsraum orientierten Termini membranständiger Proteine ubiquitin-unabhängig durch das 20S Proteasom degradiert werden könnten. Die von uns etablierte Methode legt außerdem den Grundstein für die Entwicklung von semi-automatischen Verfahren für die schnelle Identifizierung von Abbauprodukten oder anderen enzymatischen Prozessen.

Abstract (englisch)

Proteasomes are cellular proteases involved in the degradation of numerous cellular proteins. The 20S proteasome is a cylindrical 28-mer protein complex composed of two outer heptameric α -rings forming the entrance for the protein substrate and two inner heptameric β -rings carrying the catalytic sites. Numerous *in vitro* studies have provided evidence that the 20S proteasome may degrade peptides of various lengths and even unfolded full-length polypeptide chains. However, a direct demonstration that the 20S proteasome may also cleave surface-attached immobilized peptides is lacking so far.

In the present work a method was developed which characterized the proteasomale digestion of solid-phase bound peptides by peptide fragments in the aqueous phase. Initially different surfaces (gold, silicon and glass-beads) were selected and novel functionalization methods for an optimal peptide fixation were established. During this procedure, every functionalization step was characterized by different optical and electrochemistry techniques. Finally, the proteolytical fragments of the proteasome digestion of the covalent fixed peptides were analyzed by LC-MS/MS and map.

Based on the preliminary results glass-beads showed to be the eligible candidate for the further experiments due to the significant fewer amounts of peptides required for the surface fixation and yield of coupled peptides. With this optimized setup we were for the first time able to demonstrate by means of nanoLC-MS/MS the proteasomal digestion of different surface fixed peptides.

Our results clearly demonstrated that the proteasome is able to degrade N-terminal fixed peptides with a much higher degradation rate as compared to the soluble substrate. Furthermore, a modified cleavage pattern could be observed between surface-fixed or in solution proteasomale digestion. However, some digestion products are detectable in both approaches. In summary, this finding supports our initial hypothesis that proteasomes may be able to directly degrade segments of membrane-bound proteins protruding into the aqueous phase. Furthermore, this study lays the foundation for the development of semi-automatic methods to identify very rapidly proteasomale digestion products.

1. Einleitung

Das Proteasom ist ein zentraler zellulärer multikatalytischer Proteasekomplex von 1.700 kDa, welcher am Abbau von 60-70 % aller zellulären Proteine beteiligt ist. Es ist im Zytoplasma und im Zellkern von Eukaryoten lokalisiert. Kontrolle und Aufrechterhaltung der Protein-Homöostase sind elementar zum Erhalt der Zellfunktion, Zellvitalität und der Zellteilung. Das Proteasom-System spielt dabei eine wesentliche Rolle. So werden metabolische Enzyme, Transkriptionsfaktoren oder auch den Zellzyklus regulierende Proteine wie Zykline, CDK-Inhibitoren kontrolliert degradiert - ebenso werden fehlerhafte Proteine abgebaut [1].

Der 20S-Kernpartikel (20S Proteasom) von Eukaryoten ist ein zylindrischer Komplex, welcher aus 28 Untereinheiten, die in vier gestapelten heptameren Ringen angeordnet sind. Die zwei zentral gelegenen β -Ringe beherbergen die drei proteolytisch aktiven Zentren ($\beta 1$ = Caspase-ähnlich, $\beta 2$ = Trypsin-ähnlich und $\beta 5$ = Chymotrypsin-ähnlich). Die α -Untereinheiten der zwei äußeren Ringe formen die Grenze zum Eingangskanal, durch den das eingehende bzw. ausgehende Substrat geschleust wird [2,3]. Beide α -Ringe des zylindrischen 20S Proteasoms können assoziiert mit weiteren Proteinkomplexen vorliegen, wie dem Proteasom Regulator PA700 (19S Regulator Komplex). Das 19S Proteasom ist verantwortlich für die Erkennung ubiquitinerter Substratproteine, welche die Entfaltung von Proteinen und die Translokation in das 20S Proteasom durch Hydrolyse mittels ATP steuern [4,5]. Das 26S Proteasom von Eukaryoten besteht somit aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten.

Der zelluläre Proteinabbau durch das 26S Proteasom ist durch folgende Schritte charakterisiert [6]: i) Markierung des abzubauenen Proteins durch Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Moleküle, ii) Der 19S Regulator bindet die markierten Proteine, entfaltet diese ATP-abhängig und führt die Polypeptidketten durch die äußeren α -Ringe in den Kern des 20S Proteasoms, iii) Peptidbindungen der Polypeptidkette interagieren mit variabler Affinität an die β -Ringe, wo sie dann geschnitten und als 3 bis 30mere Peptide entlassen werden, iv) Die Verdauprodukte werden durch die α -Ringe ausgeschleust [7].

Neben dem Ubiquitin-abhängigen Weg können Peptide und beschädigte Proteine auch direkt durch das 20S Proteasom degradiert werden, wie in zahlreichen *in vitro* Studien mit gelöstem Substrat nachgewiesen wurde. Peters et al. konnte durch statistische Analysen Präferenzen in der Schnittwahrscheinlichkeit verschiedener, in Lösung

befindlicher Substrate, feststellen [8]. Jedoch ist bis heute wenig darüber bekannt, ob das 20S Proteasom in der Lage ist, ein trägerfixiertes Substrat abzubauen. Nur wenige Studien zeigen die Beteiligung vom Proteasom am Abbau von immobilisierten zellulären Proteinen - entweder membranständig [9–13] oder während der Translation an den Ribosomen assoziiert [14]. Die Erforschung der proteasomalen Aktivität an Trägern ist jedoch von großer Relevanz, um unbekannte Abbauege von immobilisierten Proteinen in der Zelle zu entdecken und zu verstehen.

Forschungsansatz

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode entwickelt werden, die erstmalig den proteasomalen Verdau von trägerfixierten Peptide zeigt und charakterisiert. Hierzu sollen folgende Schwerpunkte bearbeitet werden:

- (i) Auswahl und Charakterisierung von potentiell geeigneten Trägermaterialien.
- (ii) Etablierung eines Versuchsprotokolls zur Untersuchung des enzymatischen Abbaus von trägerfixierten Peptiden durch das 20S Proteasom mittels LC-MS/MS.
- (iii) Untersuchung und Charakterisierung der proteasomalen Schnittkarte von trägerfixierten Peptiden.

In dieser Arbeit sollen drei unterschiedliche Funktionalisierungsstrategien auf Gold (Au), Silizium (Si) Oberflächen und Glaskugeln (*glass-beads*) charakterisiert werden. Zunächst sollen die Kopplungserfolge, die Schichtdicke, die Homogenität sowie die Ausbeute der Träger-gekoppelten Peptide optimiert und untersucht werden. Schließlich soll festgestellt werden, ob ein proteasomaler Abbau der fixierten Peptide mit den gewählten Bedingungen analytisch nachgewiesen und somit als neue Standardmethode verwendet werden kann.

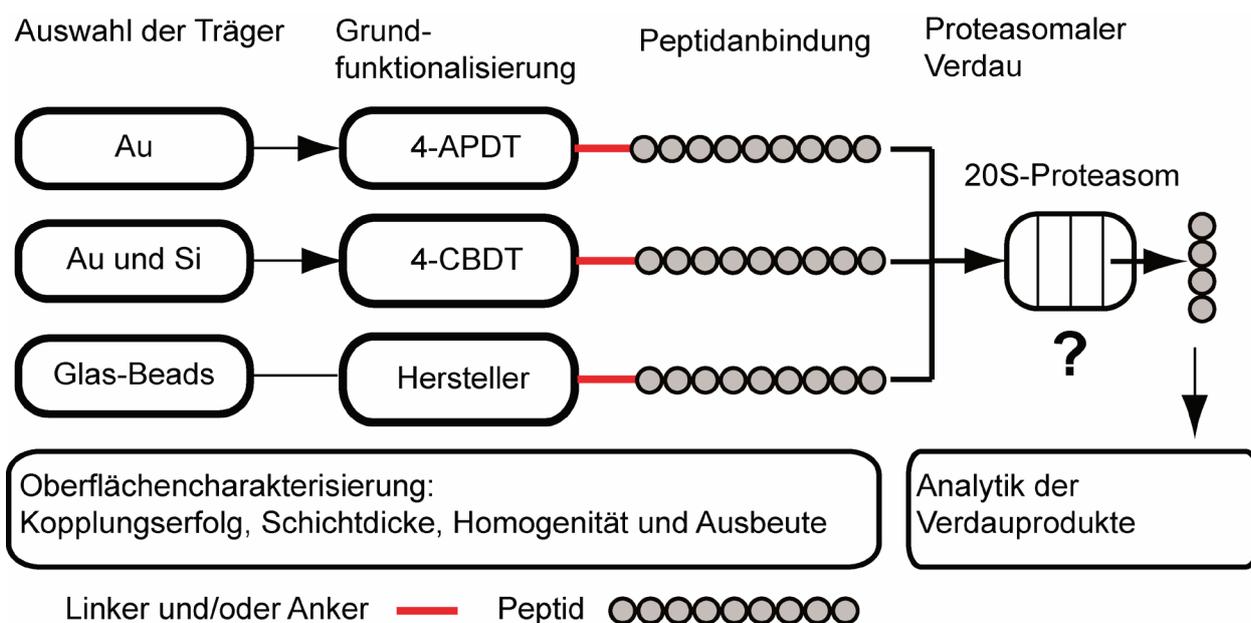


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Vorgehensweise in dieser Arbeit. Zu Anfang sollen potentielle Träger ausgewählt, funktionalisiert, charakterisiert und optimiert werden. Im Anschluss sollen die mit Peptid funktionalisierten Träger dem proteasomalen Verdau ausgesetzt und mittels LC-MS/MS getestet werden, ob der Abbau von trägerfixierten Peptiden durch das 20S Proteasom möglich ist.

Vorteile des gewählten Ansatzes sind:

- (i) Durch die Verankerung des Substrats ist die komplette Aufnahme des Substrates in das Innere des Proteasoms begrenzt. Dies schränkt die Erreichbarkeit der Peptidbindungen durch die katalytischen Untereinheiten des Proteasoms ein. Daher sind Aussagen über die mögliche Konfiguration der trägerfixierten Peptide und des Proteasoms möglich.
- (ii) Ein Festphasen basierter Peptid-Assay zur Charakterisierung des Peptidabbaus mittels LC-MS könnte zur Entwicklung eines quantifizierbaren Assay führen.
- (iii) Der Einsatz von planaren Au- oder Si-Trägern ermöglicht die Oberflächencharakterisierung durch weitere optische und physikalische Messmethoden und bietet somit die Möglichkeit eines elektrochemischen Sensors für ein semi-automatisches Verfahren zur Aktivitätsbestimmung.

2. Methodik

Eine detaillierte Beschreibung aller Versuche findet sich in den angegebenen Publikationen.

Auswahl der Oberflächen

Für die Untersuchungen zu enzymatisch katalysierten Modifikationen von trägerfixierten Peptiden wurden Träger mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften gewählt: Gold, Silizium und poröse glass-beads (Trisoperl®, VitraBio GmbH, Steinach, Germany).

Oberflächenfunktionalisierung

Gold- und Silizium-Träger: Das Funktionalisierungsreagenz 4-Aminophenyl-diazonium-tetrafluoroborat (4-APDT) wurde nach der Arbeit von Becker *et al.* Synthetisiert [15] und wie in Zhang *et al.* beschrieben an den Au-Träger kovalent gekoppelt [16]. Das Funktionalisierungsreagenz 4-Carboxybenzen-diazoniumtetrafluoroborat (4-CBDT) wurde vom Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung gestellt und wie von Sun *et al.* beschrieben an die Au- bzw. Si-Trägern gekoppelt [17]. Anschließend wurde die Oberfläche, wie unter „*glass-beads*“ beschrieben, mit einer Maleoyl-Gruppe inkubiert.

Glass-beads: Die Amino-funktionalisierten *glass-beads* wurden mit einem säurelabilen Fmoc-Rink Linker (0,3 M) und dem Ankermolekül N-Maleoyl-β-Alanin (NMbA, 0,4M) bestückt (Details in Hovestädt *et al.*) [7].

Peptidanbindung

Für die Versuche wurden die Peptide aus Tabelle 1 mit einer Reinheit von >95% hergestellt. Zusätzlich zur angegebenen Peptidsequenz wurden N-terminal Abstandsmoleküle (beta-Alanin und/oder Aminohexansäure) sowie ein Cystein hinzugefügt:

Tabelle 1: Verwende Peptide für den proteasomalen Verdau.

Sequenz	Protein/Bezeichnung
LAKDLIVPRR	CHL [16,17]
RLMYDMPHFMPPTNLGPSEKRVWMS	pp89 (MCMV); Pos. 162–186 [7]
AYISSVAYGRQVYLKLTNSHSTKVKA	LLO (<i>L.monocytogenes</i>); Pos. 291–317 [7]
EVSGLEQLESIINFEKLTWTS	Ova (Ovalbumin); Pos. 249–270 [7]

Die Maleoyl-funktionalisierten Träger wurden zweimal mit den Cystein-haltigen Peptiden (0,1 mM) inkubiert, um eine möglichst hohe Kopplungsausbeute zu erreichen. Um

unspezifisch haftende Peptide zu eliminieren, wurden die Proben gewaschen (*glass-beads* mit 8 % TFA/PBS) oder im Ultraschallbad in PBS behandelt. Anschließend wurden die verbliebenen freien Maleoyl-Gruppen mit 2-Mercaptoethanol abgesättigt [7,16,17].

Oberflächencharakterisierung

Zur Kopplungskontrolle aller Funktionalisierungsschritte von Au-/Si-Oberflächen wurde die IR-Ellipsometrie verwendet (Bruker 55 Fourier Transform Spektrometer). Die Homogenität der mit 4-CBDT funktionalisierten Oberflächen wurde mittels IR mapping Ellipsometrie am BESSY (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung) durchgeführt. Im Weiteren wurde die 4-CBDT funktionalisierte Oberfläche mittels XPS (Röntgenphotoelektronenspektroskopie) anhand der chemischen Zusammensetzung am Helmholtz-Zentrum Berlin (kundenspezifisches UHV-System) charakterisiert [16,17].

Die Kopplungsausbeute des Fmoc-Rink Linker sowie des (5/6)TAMRA-pp89 Peptides an die *glass-beads*, wurden mittels spektroskopischer Methoden bestimmt. Die Kolokalisation der gebundenen Peptide und des Proteasoms mit den funktionalisierten *glass-beads* erfolgte mittels Konfokal-Mikroskopie (invertiertes IX81 Fluoreszenz Mikroskop mit einem Fluoview 1000 Scankopf, Olympus). Das Proteasom wurde mit dem Cyanin Farbstoff Cy2, entsprechend dem Herstellerprotokoll (GE-Healthcare), markiert.

Proteasomaler Verdau

Der Verdau, der mit Peptid beladenen Oberflächen durch das 20S Proteasom, erfolgte in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH 8, T = 37°C). Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde der Überstand mit den abgespaltenen Peptiden abgenommen und das Proteasom durch Zusatz von 3% (v/v) TFA-Lösung inaktiviert. Anschließend wurden die Träger gewaschen, um verbliebene unspezifisch haftende Verdauprodukte zu entfernen. Die Lösungen wurden vereint und mittels Vakuumkonzentrator eingeeengt. Die konzentrierten Proben des Festphasen-Verdau wurden dann mittels LC-MS/MS (nanoLC-ESI-QTOF und nanoLC-MALDI-TOF) analysiert [7].

3. Ergebnisse

Oberflächencharakterisierung

Die elektrochemische 4-APDT Anbindung an die Goldoberfläche erfolgte über die zyklische Voltametrie, die mit einer elektrochemischen Quarzmikrowaage gekoppelt wurde, um die Massenzunahme direkt auf der Oberfläche zu detektieren. Die Ankopplung der Aminophenyl (AP)-Gruppe und der NMbA-Gruppe wurde durch die Detektion der spezifischen Molekülschwingungen (IR-Ellipsometrie), wie der Amino-Gruppe und des Aryl-Rings, bestätigt. Aufgrund der sterischen Hinderung wurden nur die Hälfte der NMbA-Gruppen mit Peptid funktionalisiert. Die resultierende Schichtdicke wurde mit UV-VIS Ellipsometrie bestimmt und beträgt 6-8 nm. Schließlich wurde die Immobilisierung des CHL-Peptids durch das Auffinden der Amid I Bande dokumentiert [16].

Die elektrochemische 4-CBDT Anbindung an Gold- oder Silizium-Trägern erfolgte ebenfalls über die zyklische Voltametrie. Die Ankopplung der Carboxybenzen (CB)-Gruppe wurde anhand einer spezifischen Bande für die Reduktion des Diazoniumsalzes gezeigt. Wie bei dem oben beschriebenen Prozess entsteht während der radikalischen Reaktion ebenfalls ein mehrschichtiges System. Die mit Benzoesäure funktionalisierte Oberfläche wurde in drei Schritten weiter funktionalisiert: i) mit 2,3-Di-aminopropan, ii) mit NMbA und iii) mit dem CHL-Peptid. Alle Reaktionsschritte wurden mittels IR-Ellipsometrie kontrolliert. Der Erfolg jedes Kopplungsschrittes wurde anhand der spezifischen IR Banden in den $\tan \Psi$ Spektren gezeigt und eine Schichtdicke von ca. 7 nm ermittelt. Die XPS-Spektren bestätigten die IR-Ellipsometrie Ergebnisse.

Mittels IR-Kartierung (IR-mapping) konnte jedoch festgestellt werden, dass die CB-Oberfläche auf Gold große Inhomogenitäten aufweist [17].

Die Funktionalisierung der *glass-beads* wurde sowohl über die photometrische Bestimmung der Fmoc-Gruppe des Rink Linkers, als auch über die photometrische Bestimmung des (5/6)-TAMRA-pp89 nach Abspaltung von der Oberfläche vorgenommen. In beiden Fällen stimmen die Werte gut überein und zeigen im Durchschnitt eine Flächenbeladung von 0,03 nmol/cm² (siehe Tabelle 2) [7].

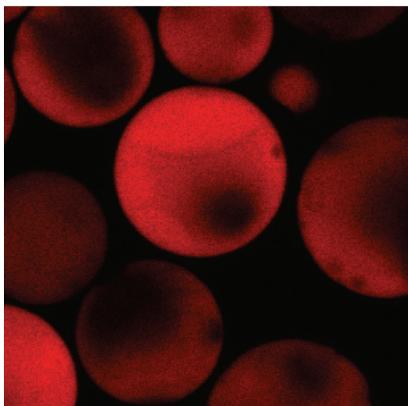
Tabelle 2: Photometrische Quantifizierung der Kopplungsausbeute, des Fmoc-Rink Linkers und des (5/6)TAMRA-pp89 Peptids auf *glass-beads*.

	Fmoc	s	TAMRA(5/6)	s
Γ [nmol/cm ²]	3,4E-02	2,4E-03	2,5E-02	3,3E-03
Γ [nmol/mg]	1,8E+04		1,3E+04	
Fläche (cm ²)	26640		26640	
Stoffmenge - Peptid (nmol)	915		667	
Stoffmenge - Proteasom (nmol)	3,6E-03		3,6E-03	
Verhältnis Peptid/Proteasom	2,6E+05		1,9E+05	

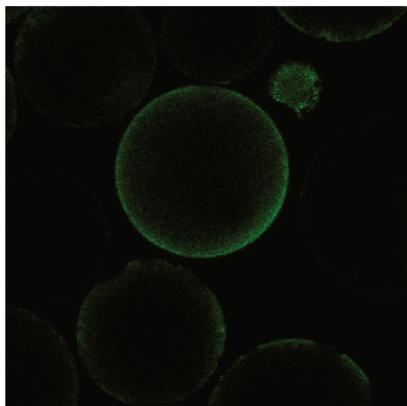
Jeder Ansatz wurde mit 50 mg *glass-beads* und in einem Reaktionsvolumen von 500 μ L durchgeführt.

Die Kolokalisation des Modellpeptids mit dem Proteasom wurde mittels Konfokal-Mikroskopie erbracht (Abbildung 2). An der Oberfläche der *glass-beads* ist eine eindeutige Kolokalisation der beiden Moleküle zu beobachten, während in den Poren innerhalb der *glass-beads* das Peptid für das Proteasom aus sterischen Gründen unerreichbar bleibt [7].

A) TAMRA(5/6)-markiertes Peptid (rot)



B) FITC-markiertes 20S Proteasom (grün)



C) Fusioniert (A) und (B)

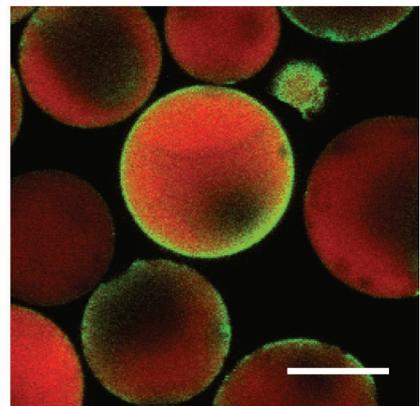


Abbildung 2: Konfokal Mikroskopie des Cy2-markierten Proteasoms und des TAMRA(5/6)-markierten pp89 Peptids an der Oberfläche der *glass-beads*. (A) TAMRA(5/6)-markiertes Modellpeptid (rot). (B) Cy2-markiertes 20S Proteasom (grün). (C) fusioniertes Bild von (A) und (B) [7].

Verdau trägerfixierter Peptide durch das 20S Proteasom

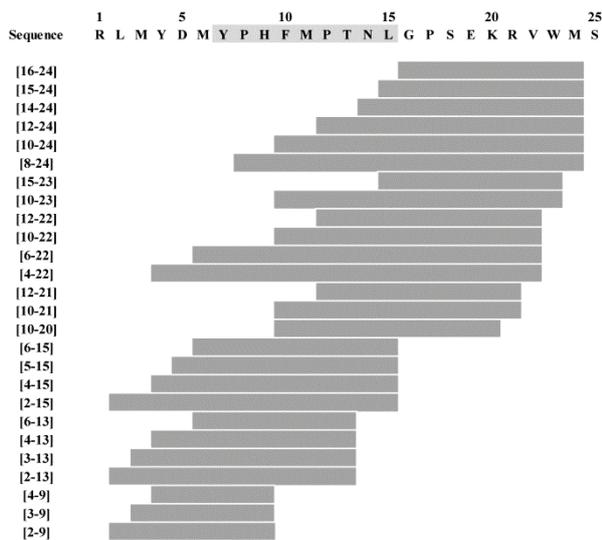
Nach Optimierungsschritten des Versuchsaufbaus mit der Protease Trypsin, im Hinblick auf die Funktionalität der Methode und der Optimierung der Analytik mittels LC-MS,

wurde als Träger für den proteasomalen Peptidabbau die *glass-beads* ausgewählt. Anschließend wurde das pp89 Peptid an die *glass-beads* gekoppelt, durch das 20S Proteasom verdaut und die Fragmente mittels nanoLC-ESI-QTOF analysiert.

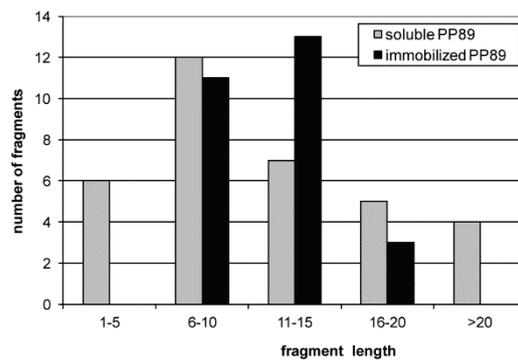
Ziel war es, das Schnittmuster des trägerfixierte Peptids, im Vergleich zum gelösten Peptid, möglichst genau zu beschreiben. Bereits nach einer Minute Inkubationszeit konnten bei dem trägerfixierten Peptid bereits Verdauprodukte identifiziert werden (Abbildung 2A), während bei dem Verdau des gelösten Peptides, erste Verdauprodukte frühestens nach 15 min zu beobachten waren. Der Vergleich des 1 min Verdaus des trägerfixierten Peptides mit dem 1 h Verdau (siehe Abbildung in Hovestädt al et. [7]) des gelösten Peptides zeigten erhebliche Unterschiede im Schnittkartenmuster und der Längenverteilung der Produkte (Abbildung 2B und C). Besonders auffällig ist der Schnitt hinter Arg1, der mit dem gelösten Substrat niemals zuvor beobachtet wurde.

Zur Validierung der Methode wurden zwei weitere Peptide immobilisiert (LLO und OVA) und dem proteasomalen Verdau ausgesetzt. Die Schnittkarten des proteasomalen Verdaus beider Peptide in Lösung wurden bereits früher charakterisiert [7]. Beim proteasomalen Verdau des immobilisierten LLO Peptides konnten ebenfalls schon nach einer Minute Verdauprodukte identifiziert werden, die auch ein abweichendes Schnittmuster, im Vergleich zum Verdau des gelösten Substrates, zeigten [7]. Dagegen, konnten erste Verdauprodukte des trägerfixierten OVA Peptids erst nach einer 10 minütigen Inkubationsdauer detektiert werden, wobei die identifizierten Fragmente denen des Abbaus des gelösten Peptids entsprechen.

A) Immobilisiertes pp89 - 1 min Verdauzeit



B) Längenverteilung der Fragmente



C) Schnittpräferenzen

# SS	0	1	2	6	2	3	5	0	0	3	4	0	0	0	12	1	1	0	0	0	0	0	5	1	4
# IS	3	2	3	1	3	0	1	0	6	0	3	0	5	2	5	0	0	0	1	2	4	2	6		
	R	L	M	Y	D	M	Y	P	H	F	M	P	T	N	L	G	P	S	E	K	R	V	W	M	S
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

Abbildung 3: Proteasomal generierte Fragmente des immobilisierten Modell-Peptids pp89 bei 37°C. Alle Fragmente wurden mittels nanoLC-ESI-QTOF identifiziert. A) Die detektierten Fragmente werden als graue Balken dargestellt, links daneben ist die Position innerhalb der Sequenz angegeben. Die Verdauzeit betrug 1 min. B) Längenverteilung der proteolytisch gebildeten Fragmente des immobilisierten Substrats im Vergleich zum gelösten [7]. C) Die Schnittpräferenzen des immobilisierten Substrates (IS – immobilised substrate) und die des gelösten Substrates (SS - soluble substrate) wurden anhand der C-Termini oder N-Termini der Fragmente quantifiziert [7].

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, welches die Charakterisierung des enzymatischen Abbaus von kovalent gebundenen Peptiden ermöglicht. Mit dieser neu entwickelten Methode konnte erstmals gezeigt werden, dass das 20S Proteasom in der Lage ist, trägerfixierte Peptide zu verdauen.

Während der Methodenentwicklung wurden drei Oberflächen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften teilweise neu charakterisiert und auf ihre Eignung für die Aufgabenstellung getestet. Im Speziellen wurden Gold- und Silizium-Träger für die kovalente Anbindung der Peptide mittels Michael-Addition und einer neuartigen Grundfunktionalisierung beschrieben. Im Weiteren wurden *glass-beads* mit funktionalisierbaren Aminogruppen charakterisiert und für den proteasomalen Verdau von trägerfixierten Peptiden eingesetzt.

Nach verschiedenen Optimierungsschritten (Oberflächenaktivierung, Peptidbeladung, etc.) hat sich herausgestellt, dass die *glass-beads* der geeignetste Träger für den proteasomalen Abbau sind. Die Oberflächencharakteristika der aminofunktionalisierten *glass-beads* wurden photometrisch über die Kopplungsausbeute des Fmoc-Rink Linker und des TAMRA-markierten Peptides bestimmt, wobei in beiden Fällen eine absolute Stoffmenge im hohen nanomolaren-Bereich detektiert werden [7]. Diese hohe Verfügbarkeit der Peptide ist wichtig, da aufgrund der porösen Struktur der *glass-beads*, nicht alle gebundenen Peptide tatsächlich für das Proteasom zugänglich sind (Abbildung 2). Im Vergleich zu den getesteten planaren Oberflächen ist die verfügbare Menge an gebundenem Peptid durch die kugelförmige Geometrie der *glass-beads* für die anschließende Analytik des proteasomalen Verdau mittels nanoLC-MS optimal.

Die hier vorgestellten Ergebnisse des enzymatischen Verdaus an *glass-beads* fixierten Peptiden durch das 20S Proteasom zeigen eine erheblich beschleunigte Abbaurrate und ein verändertes Schnittbild im Vergleich zum Verdau des Substrates in Lösung. Der beschleunigte Abbau ist womöglich in der Aktivierung des Proteasoms durch Kontakt mit der Oberfläche oder durch Konzentrations- und Orientierungseffekte bezüglich des peptidischen Substrates begründet. Die Beobachtung, dass Proteasomen ein an der Membran des endoplasmatischen Retikulums gebundenen carboxymethylierten Lysozyms sehr viel schneller abbauen kann als frei im Zytosol vorliegendes Enzym, bestätigen diese Hypothese [18].

Die gefundenen unterschiedlichen Schnittmuster könnten dadurch erklärbar sein, dass das gelöste Substrat durch eine längere Verdauezeit sekundär prozessiert wird. Des Weiteren wurde eine Längenanalyse mittels einer MD-Simulation (Molecular Dynamics) des Linker-pp89-Konstruktes durchgeführt. Dabei wurde der Abstand zwischen Oberfläche und gebundenem Peptid bestimmt und dieser im Vergleich mit den Röntgenstrukturdaten des Proteasoms dargestellt [7]. Auf Basis der Simulationsdaten wurde festgestellt, dass der Schnitt hinter dem N-terminalen Arg1 nicht möglich ist, da diese Schnittstelle für kein aktives Zentrum des Proteasoms erreichbar ist [7]. Da jedoch keine Aussagen über die Amino-Funktionalisierung gemacht werden können, könnte der Abstand zwischen Oberfläche und Peptid in der Realität größer sein als berechnet. Dies begründet unter anderem die enorme Relevanz der exakten Bestimmung der Oberflächencharakteristika, wie z.B. der Schichtdicke.

Die Verwendung planarer Au- und Si-Träger erlaubte den Einsatz etablierter elektrochemischer und optischer Messverfahren zur Charakterisierung der funktionalisierten Oberflächen. Aus diesen Gründen wurde die Funktionalisierung von Gold- und Silizium-Trägern im Rahmen dieser Arbeit beschrieben. Hierzu wurden zwei Funktionalisierungsmethoden untersucht: die Aminophenyl (AP)- [16] und die Carboxybenzen (CB)- Oberflächenfunktionalisierung [17]. An beiden neuartig funktionalisierten Trägern konnte sowohl β -Alanin-Maleoyl effektiv gebunden werden, als auch im Anschluss ein Modellpeptid. Jedoch bedarf es weiterer Optimierungen des Methodenprotokolls, um Kopplungsverluste und Inhomogenitäten innerhalb der Peptidbeschichtung zu reduzieren. Die von uns erhaltenen Ergebnisse der Funktionalisierungsversuche auf Gold und Silizium könnten, wie Cao et al zeigen konnten, zu einer Entwicklung eines elektrochemischen Sensors für die Charakterisierung proteolytischer Ereignisse führen [19].

Die Weiterentwicklung des Methodenprotokolls für die Beschichtung von metallischen planaren Trägern eröffnet zahlreiche neue analytische Detektionsmöglichkeiten für die schnelle Charakterisierung des proteasomalen Verdaus von trägerfixierten Peptiden, wie auch für die elektrochemische Detektion von Protein-Protein Interaktionsstudien oder für die Charakterisierung alternativer enzymatischer Systeme. Zum Beispiel konnte mit Hilfe des gezeigten Diazonium-Linkers von uns eine Peptid/Antikörper Interaktion erfolgreich demonstriert werden [20].

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit deutlich herausgearbeitet werden, dass sphärische Oberflächen (hier *glass-beads* mit einem Durchmesser von 50-100 μm) für die Analyse des proteasomalen Abbaus trägerfixierter Peptide sehr gut geeignet sind. Aufgrund ihrer Eigenschaften kann im Vergleich zu planaren Trägern eine drastisch reduzierte Menge von Enzym verwendet werden. Des Weiteren erhält man aufgrund der größeren Oberfläche der *glass-beads* eine höhere absolute Stoffmenge an gebundenen Peptid und somit eine höhere Ausbeute an Verdauprodukten, die für den nanoLC-MS/MS Nachweis ausreicht. Somit hat der hier vorgestellte Versuchsaufbau ein hohes Maß an technologischem Potenzial, z.B. im Einsatz als kontinuierliches Durchflusssystem für kinetische Untersuchungen des proteasomalen Verdaus. Dies bietet somit die Möglichkeit frühe proteasomale Abbauprodukte zu identifizieren, da Sekundär-prozessierungsereignisse vermieden werden können.

5. Literaturverzeichnis

- [1] A. Ciechanover, Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting, *Medicina (Mex.)*, 70 (2010) 105–119.
- [2] M. Groll, M. Bajorek, A. Köhler, L. Moroder, D.M. Rubin, R. Huber, M.H. Glickman, D. Finley, A gated channel into the proteasome core particle, *Nat. Struct. Biol.*, 7 (2000) 1062–1067.
- [3] A. Köhler, M. Bajorek, M. Groll, L. Moroder, D.M. Rubin, R. Huber, M.H. Glickman, D. Finley, The substrate translocation channel of the proteasome, *Biochimie*, 83 (2001) 325–332.
- [4] G.N. DeMartino, R.J. Proske, C.R. Moomaw, A.A. Strong, X. Song, H. Hisamatsu, K. Tanaka, C.A. Slaughter, Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 3112–3118.
- [5] G.N. DeMartino, C.R. Moomaw, O.P. Zagnitko, R.J. Proske, M. Chu-Ping, S.J. Afendis, J.C. Swaffield, C.A. Slaughter, PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 20878–20884.
- [6] C.M. Crews, Feeding the machine: mechanisms of proteasome-catalyzed degradation of ubiquitinated proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7 (2003) 534–539.
- [7] M. Hovestädt, U. Kuckelkorn, A. Niewienda, C. Keller, A. Goede, B. Ay, S. Günther, K. Janek, R. Volkmer, H.-G. Holzhütter, Rapid degradation of solid-phase bound peptides by the 20S proteasome, *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*, (2013).
- [8] B. Peters, K. Janek, U. Kuckelkorn, H.-G. Holzhütter, Assessment of proteasomal cleavage probabilities from kinetic analysis of time-dependent product formation, *J. Mol. Biol.*, 318 (2002) 847–862.
- [9] M. Benharouga, M. Haardt, N. Kartner, G.L. Lukacs, COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments, *J. Cell Biol.*, 153 (2001) 957–970.
- [10] Y. Gong, J.N. Lee, P.C.W. Lee, J.L. Goldstein, M.S. Brown, J. Ye, Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake, *Cell Metab.*, 3 (2006) 15–24.
- [11] R.Y. Hampton, R.G. Gardner, J. Rine, Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein, *Mol. Biol. Cell*, 7 (1996) 2029–2044.
- [12] T.U. Mayer, T. Braun, S. Jentsch, Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein, *EMBO J.*, 17 (1998) 3251–3257.
- [13] C.L. Von Zee, E.B. Stubbs Jr, Geranylgeranylation facilitates proteasomal degradation of rho G-proteins in human trabecular meshwork cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 52 (2011) 1676–1683.

- [14] G.C. Turner, A. Varshavsky, Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo, *Science*, 289 (2000) 2117–2120.
- [15] H.G.O. Becker, K. Grossmann, Spectral Sensitization of Dediazonation by the 2-electron-transfer system meso-tetraphenylporphinato-dichlorostannate(IV)/10-methyl-9-Phenyl-9,10-dihydro-acridine, *J. Für Prakt. Chem.*, 332 (1990) 241–250.
- [16] X. Zhang, G. Sun, M. Hovestädt, V. Syritski, N. Esser, R. Volkmer, S. Janietz, J. Rappich, K. Hinrichs, A new strategy for the preparation of maleimide-functionalised gold surfaces, *Electrochem. Commun.*, 12 (2010) 1403–1406.
- [17] G. Sun, M. Hovestädt, X. Zhang, K. Hinrichs, D.M. Rosu, I. Lauermann, C. Zielke, A. Vollmer, H. Löchel, B. Ay, H.-G. Holzhütter, U. Schade, N. Esser, R. Volkmer, J. Rappich, Infrared spectroscopic ellipsometry (IRSE) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) monitoring the preparation of maleimide-functionalized surfaces: from Au towards Si (111), *Surf. Interface Anal.*, 43 (2011) 1203–1210.
- [18] H. Hori, T. Nembai, Y. Miyata, T. Hayashi, K. Ueno, T. Koide, Isolation and characterization of two 20S proteasomes from the endoplasmic reticulum of rat liver microsomes, *J. Biochem. (Tokyo)*, 126 (1999) 722–730.
- [19] Y. Cao, J. Yu, B. Bo, Y. Shu, G. Li, A simple and general approach to assay protease activity with electrochemical technique, *Biosens. Bioelectron.*, 45 (2013) 1–5.
- [20] X. Zhang, A. Tretjakov, M. Hovestaedt, G. Sun, V. Syritski, J. Reut, R. Volkmer, K. Hinrichs, J. Rappich, Electrochemical functionalization of gold and silicon surfaces by a maleimide group as a biosensor for immunological application, *Acta Biomater.*, 9 (2013) 5838–5844.

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Marc Hovestaedt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **M. Hovestädt**, U. Kuckelkorn, A. Niewienda, C. Keller, A. Goede, B. Ay, S. Günther, K. Janek, R. Volkmer, H.-G. Holzhütter, Rapid degradation of solid-phase bound peptides by the 20S proteasome, J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc., (2013)- Impact-Factor (2012): 2.071

Beitrag im Einzelnen: 50 %

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Arbeit, Auswahl der Träger, Probenvorbereitung und Optimierung der Probenvorbereitung: Oberflächenfunktionalisierung und proteasomaler Verdau, Optimierung der Analytik der Verdauprodukte und anschließende Messung mittels nanoLC-ESI-QTOF, Interpretation der Resultate

Publikation 2: X. Zhang, G. Sun, **M. Hovestädt**, V. Syritski, N. Esser, R. Volkmer, S. Janietz, J. Rappich, K. Hinrichs, A new strategy for the preparation of maleimide-functionalised gold surfaces, Electrochem. Commun., 12 (2010) 1403–1406. - Impact-Factor (2012): 4.425

Beitrag im Einzelnen: 25 %

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Arbeit, Durchführung und Testung photochemischer Oberflächenfunktionalisierungen, Organisation von Projekttreffen und Zusammenfassung der Ergebnisse

Publikation 3: G. Sun, **M. Hovestädt**, X. Zhang, K. Hinrichs, D.M. Rosu, I. Lauermann, C. Zielke, A. Vollmer, H. Löchel, B. Ay, H.-G. Holzhütter, U. Schade, N. Esser, R. Volkmer, J. Rappich, Infrared spectroscopic ellipsometry (IRSE) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) monitoring the preparation of maleimide-functionalized surfaces: from Au towards Si (111), Surf. Interface Anal., 43 (2011) 1203–1210. - Impact-Factor (2012): 1.2

Beitrag im Einzelnen: 30 %

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Arbeit, Durchführung und Testung photochemischer Oberflächenfunktionalisierungen, Organisation von Projekttreffen und

Zusammenfassung der Ergebnisse

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Prof. Hermann-Georg Holzhütter

Unterschrift des Doktoranden

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1 :

Hovestädt, M., Kuckelkorn, U., Niewianda, A., Keller, C., Goede, A., Ay, B., Günther, S., Janek, K., Volkmer, R., and Holzhütter, H.-G. (2013). Rapid degradation of solid-phase bound peptides by the 20S proteasome.

J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc. 19, 588–597.

DOI: 10.1002/psc.2536

Publikation 2:

Sun, G., Hovestädt, M., Zhang, X., Hinrichs, K., Rosu, D.M., Lauermann, I., Zielke, C., Vollmer, A., Löchel, H., Ay, B., et al. (2011). Infrared spectroscopic ellipsometry (IRSE) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) monitoring the preparation of maleimide-functionalized surfaces: from Au towards Si (111).

Surf. Interface Anal. 43, 1203–1210.

DOI: 10.1016/j.elecom.2010.07.032

Publikation 3:

Zhang, X., Sun, G., Hovestädt, M., Syritski, V., Esser, N., Volkmer, R., Janietz, S., Rappich, J., and Hinrichs, K. (2010). A new strategy for the preparation of maleimide-functionalised gold surfaces.

Electrochem. Commun. 12, 1403–1406.

DOI: 10.1002/sia.3699

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

- [1] **M. Hovestädt**, U. Kuckelkorn, A. Niewianda, C. Keller, A. Goede, B. Ay, S. Günther, K. Janek, R. Volkmer, H.-G. Holzhütter, Rapid degradation of solid-phase bound peptides by the 20S proteasome, *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*, (2013).
- [2] X. Zhang, A. Tretjakov, **M. Hovestaedt**, G. Sun, V. Syritski, J. Reut, R. Volkmer, K. Hinrichs, J. Rappich, Electrochemical functionalization of gold and silicon surfaces by a maleimide group as a biosensor for immunological application, *Acta Biomater.*, 9 (2013) 5838–5844.
- [3] G. Sun, **M. Hovestädt**, X. Zhang, K. Hinrichs, D.M. Rosu, I. Lauermann, C. Zielke, A. Vollmer, H. Löchel, B. Ay, H.-G. Holzhütter, U. Schade, N. Esser, R. Volkmer, J. Rappich, Infrared spectroscopic ellipsometry (IRSE) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) monitoring the preparation of maleimide-functionalized surfaces: from Au towards Si (111), *Surf. Interface Anal.*, 43 (2011) 1203–1210.
- [4] G. Sun, D.M. Rosu, X. Zhang, **M. Hovestädt**, S. Pop, U. Schade, D. Aulich, M. Gensch, B. Ay, H.-G. Holzhütter, D.R.T. Zahn, N. Esser, R. Volkmer, J. Rappich, K. Hinrichs, Synchrotron infrared spectroscopic ellipsometry for characterization of biofunctional surfaces, *Phys. Status Solidi B*, 247 (2010) 1925–1931.
- [5] X. Zhang, G. Sun, **M. Hovestädt**, V. Syritski, N. Esser, R. Volkmer, S. Janietz, J. Rappich, K. Hinrichs, A new strategy for the preparation of maleimide-functionalised gold surfaces, *Electrochem. Commun.*, 12 (2010) 1403–1406.
- [6] M.J. Sereda, S. Hartmann, D.W. Büttner, R. Volkmer, **M. Hovestädt**, N. Brattig, R. Lucius, Characterization of the allergen filarial tropomyosin with an invertebrate specific monoclonal antibody, *Acta Trop.*, 116 (2010) 61–67.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marc Hovestaedt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung und Anwendung eines neuartigen Festphasen-Assays für die Untersuchung des enzymatischen Abbaus von trägerfixierten Peptiden“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Zuerst richtet sich mein Dank an meinen Doktorvater Prof. Hermann-Georg Holzhütter und an Rudolf Volkmer, die meine Arbeit mit großem Einsatz betreut haben. Für meine theoretische und praktische Arbeit standen sie mir jeder Zeit zur Seite und waren stets für Diskussionen offen. Dadurch schufen sie eine überaus angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre. Ihre fachliche und persönliche Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren gilt mein Dank den Arbeitsgruppen Holzhütter und Volkmer, insbesondere Herrn Dr. Bernhard Ay. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Jörg Rappich und PD Dr. Karsten Hinrichs für die tolle Zusammenarbeit bedanken. Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem vor kurzer Zeit verstorbenen Vater, die mich stets unterstützt und mir den nötigen Rückhalt gegeben haben, als auch meinen Geschwistern Tim und Karina.