Gefördert durch:

Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Universität Potsdam

IBZT-01: PepTight – Lasst die Biologie ran – Peptide umgarnen entscheidende Rohstoffe: die „natürliche“ Trennung von Lanthaniden (Teilprojekt B)

Dini Marlina, Yannic Müllers, Yulia Perevedentseva, Heiko M. Möller, Ulrich Glebe und Michael U. Kumke

031B1122B

Teil II - Sachbericht

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B1122B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“

1. Darstellung der Ergebnisse

Präambel

Das Forschungsvorhaben „Lasst die Biologie ran – Peptide umgarnen entscheidende Rohstoffe: die „natürliche“ Trennung von Lanthaniden“ (PepTight) ist ein Verbundvorhaben, das gemeinsam von Arbeitsgruppen des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf (HZDR) und der Universität Potsdam (UP) bearbeitet wurde. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Arbeiten an der UP dargestellt, die komplementär zu Arbeiten am HZDR stattgefunden haben und sich dem Arbeitsplan folgend ergänzen.

Untersuchung von Lanthanoid (Ln(III)) – Peptid-Komplexen mittels zeitaufgelöster Laserfluoreszenzspektroskopie (TRLFS)

Ein Protokoll zur Durchführung der TRLFS-Experimente wurde etabliert und zur Untersuchung der Komplexierung von Ln(III)-Ionen durch die in der Tabelle 1A aufgelisteten Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate verwendet. Mit der etablierten Methodik konnte das gesamte Spektrum der im Projekt hergestellten Substanzen untersucht werden, wobei die Anwendbarkeit und Messzeitanforderung neben Selektivität und Sensitivität weitere Vorteile sind. In den TRLFS-Experimenten wurde die Komplexierung vornehmlich mit Eu(III) als repräsentativem Lanthanoid untersucht, in ausgewählten Fällen wurden auch Tb(III), Sm(III) und Dy(III) als lumineszierende Ln(III)-Ionen eingesetzt so wie Lu(III) in kompetitiven Untersuchungen.

Die Experimente wurden in Form von Titrationsreihen in der Regel unter Vorlage des Ln(III) durchgeführt. In ausgewählten Fällen wurde durch Variation der Vorlagelösung ein großer Bereich der molaren Verhältnisse von Peptid-Verbindung und Lanthanoid überstrichen, um die Untersuchung der möglichen Bildung von Komplexen mit anderer als 1:1 Stöchiometrie zu erlauben, z.B. durch Vorlage des Peptides und die Erhöhung der Eu(III)-Konzentration. Die Untersuchungen erfolgten bei einem pH-Wert von fünf, der ohne den Einsatz eines Puffers eingestellt wurde (die pH-Wert-Auswahl erfolgte vor dem Hintergrund der zu erwartenden Matrixbedingungen und zur Vermeidung von Hydrolyse-Konkurrenzreaktionen der Ln(III)).

Eine Herausforderung in der Untersuchung der Peptide mit veränderter Aminosäuresequenz ist die Bestimmung der jeweiligen Peptid-Konzentration (deren Kenntnis ist essentiell für die Bestimmung des entsprechenden K_D-Wertes). Für den Fall, dass eine aromatische Aminosäure in der Sequenz enthalten ist, kann die Konzentration mittels einer Absorptionsmessung bei λ = 280 nm nach einem etablierten Protokoll erfolgen. Für die in den Projektphasen II+III hergestellten neuen Peptidsequenzen ist allerdings nicht immer eine derartige Aminosäure in der Sequenz enthalten, so dass alternative Protokolle adaptiert werden mussten, nämlich einmal die optische Bestimmung der Konzentration durch Absorptionsmessung bei λ = 205 nm und mittels NMR-Spektroskopie unter Zugabe eines Vergleichsstandards.

Die TRLFS-Daten für Eu(III) (Abb. 1, links) wurden unter zur Hilfenahme einer PARAFAC-Analyse ausgewertet und so die Spektren für die vorhandenen lumineszierenden Spezies, deren Lumineszenzabklingkinetiken sowie die relativen Anteile in der Proben bestimmt (s. Abb. 2). Für Eu(III) als Referenzlanthanoid ist dies eine robuste Auswertestrategie, da sich die Koordination sowohl in Veränderungen der spektralen Intensitätsverteilung wie auch in den Lumineszenzkinetiken ablesen lässt, so dass eine chemometrische Datenanalyse mit PARAFAC robuste Ergebnisse liefert. Ein Schlüsselaspekt hierbei ist die Korrektur der Lumineszenzintensität-basierten Konzentrationen um die Quanteneffizienz der jeweiligen Spezies, was durch eine Judd-Ofelt-Analyse der speziesselektiven Emissionsspektren gelingt. Für die übrigen untersuchten Ln(III) = Dy(III), Sm(III), Tb(III) wurde die

Lumineszenzintensitätsänderung bzw. die Veränderung der Lumineszenzabklingkinetik ohne vorgeschaltete chemometrische Analyse durchgeführt.

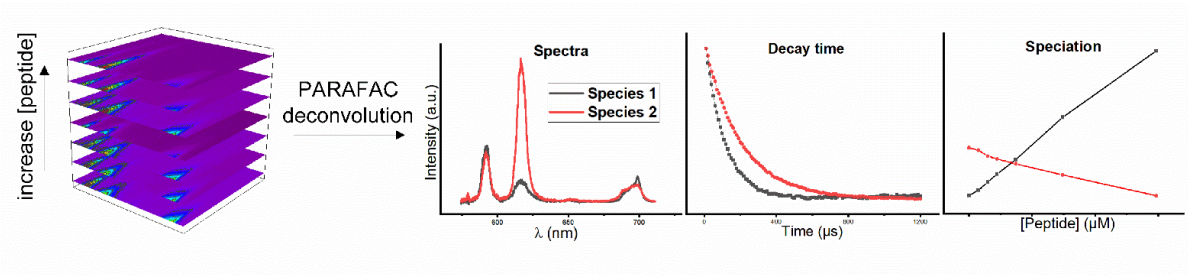


Abb. 1: Schema der Auswertestrategie zur Speziation mittels TRLFS-Daten (entnommen aus Marlina et al. 2024, s.u.). Aus der Analyse werden die Komplex-Zusammensetzung und die konditionellen Bindungskonstanten erhalten.

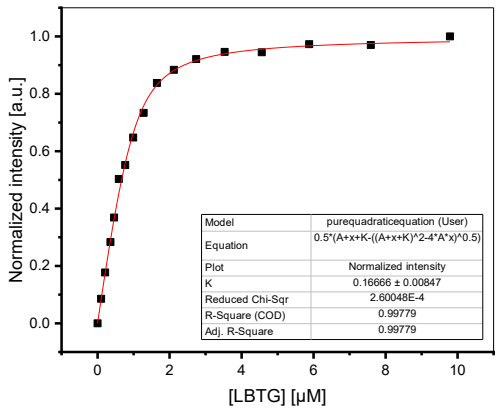


Abb: 2 Titration von Europium ([Eu(III)] = 1 µM) mit dem Peptid LBTG (siehe Tabelle 1 am Ende des Berichtes für weitere Details zum Peptid). Gezeigt ist die Zunahme der Lumineszenzintensität des $^5D_0$-$^7F_2$ Übergang von Eu(III). Durch die Bindung von LBTG werden aus der ersten Koordinationsspähre des Europium-Aquoions Wassermoleküle verdrängt. Dies hat zur Folge, dass i) die Löschung der Luminieszenz reduziert wird und ii) dass sich die Symmetrie des Komplexes verändert. Beide Effekte führen insgesamt zu einer Zunahme der Lumineszenzintensität. Die rote Linie ist die Anpassung der experimentellen Daten mittels eines 1:1-Komplexierungsmodels zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D.

In Abb. 2 ist beispielhaft die Auswertung der Lumineszenzdaten zur Ermittlung des K_D-Wertes dargestellt. Die rote Linie stellt den angepassten Kurvenverlauf für den Fall eines 1:1-Komplexes dar.

Es wurden Parameter der Lösungsmittelchemie wie z.B. die Ionenstärke variiert, um Querempfindlichkeiten wie sie für reale Matrices zu erwarten sind, abzubilden. Die Anwesenheit von einwertigen Kationen wie Natrium und Kalium wird auch für einen sehr großen Überschuss toleriert und hat keinen Effekt auf die Bindung des Ln(III)-Ions durch das Peptid. Bei höherwertigen Ionen wie Ca(II) ist dies nicht mehr uneingeschränkt der Fall und es tritt eine Reduktion der Ln(III)-Bindung durch das Peptid auf.

Untersuchung der Komplex-Stöchiometrie mittels TRLFS

Die Titrationsexperimente wurden zur Betrachtung der Komplex-Stöchiometrie unter zwei unterschiedlichen Ausgangsbedingungen durchgeführt: i) Vorlage des jeweiligen Peptides (oder Peptid-Polymer-Konjugates. s.u.) und schrittweiser Zugabe der Ln(III)-Stammlösung und ii) Vorlage der Ln(III)-Lösung und schrittweiser Zugabe des Peptides (oder Peptid-Polymer-Konjugates). Dadurch wurden auch extremere molare Verhältnisse zwischen den beiden Bindungspartnern realisiert, um die Bildung von weiteren Stöchiometrien (2:1 bzw. 1:2 Komplexe) zu untersuchen. Die TRLFS-Daten haben hier kein einheitliches Bild ergeben. Im überwiegenden Bereich der untersuchten molaren Verhältnisse von Peptid:Ln(III) wurde ein 1:1-Komplex gefunden.

Bei einem großen Überschuss an Lanthanoid kann das Vorliegen eines „2 Lanthanoide – 1 Peptid"-Komplexes (2:1-Komplex) möglich sein, ist allerdings auf Basis die TRLFS-Daten nicht zweifelsfrei zu bestimmen, da die spektroskopischen Parameter, die in einer PARAFAC-Analyse mit der Annahme eines 2:1-Komplexes erhalten werden, sich zu stark ähneln. Im NMR-Experiment bzw. in den ITC-Untersuchungen gibt es für die Existenz eines 2:1-Komplexes belastbarere Indizien. Andererseits ist für den Fall des anderen Extrems (Peptid-Verbindung liegt in großem Überschuss vor) die Bildung eines 1:2-Komplexes in Betracht zu ziehen. NMR-spektroskopisch finden sich in den Titrationsexperimenten keine klaren Indizien für die Bildung von 1:2-Komplexen. Dies könnte allerdings darin begründet sein, dass sich 1:1- und 1:2-Komplexe zu wenig in den methodenspezifischen Signalen unterschieden. Aufgrund der Dynamik der Interaktion und der – vermutlich – involvierten Aminosäureseitenketten wäre das nicht überraschend. Ausschließen lässt sich die Annahme daher auf Basis der NMR-Ergebnisse nicht. Obwohl im Rahmen der geplanten Anwendungen zur Extraktion von Ln(III) aus Abfallströmen Szenarien mit signifikant überhöhten molaren Verhältnissen der Reaktionspartner nicht sehr wahrscheinlich sind, wurde ein zusätzliches Referenzexperiment durchgeführt.

Mit der Herstellung von zwei EF4-Fragmenten (DIDGDG – Fragment 1 und QVNYEE – Fragment 2; hergestellt durch Verbundpartner HZDR) wurde die Komplexbildung bzgl. der an der Bindung hauptsächlich beteiligten Aminosäuren in der EF4-Hand-Sequenz zusätzlich hinterfragt. Da es sich bei Lanthaniden um harte Lewis-Säuren handelt, bilden diese bevorzugt mit harten Lewis-Basen Komplexe. Im Fall von Fragment 1 und 2 sind dies die freien Carboxylgruppen der Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E). Deren Positionierung innerhalb der Aminosäuresequenz ist für die Ausbildung und Stabilität von zentraler Bedeutung (s. dazu auch MD-Simulationen, HZDR) und daher war die Untersuchung der Fragmente 1 und 2 für diesen Aspekt spannend.

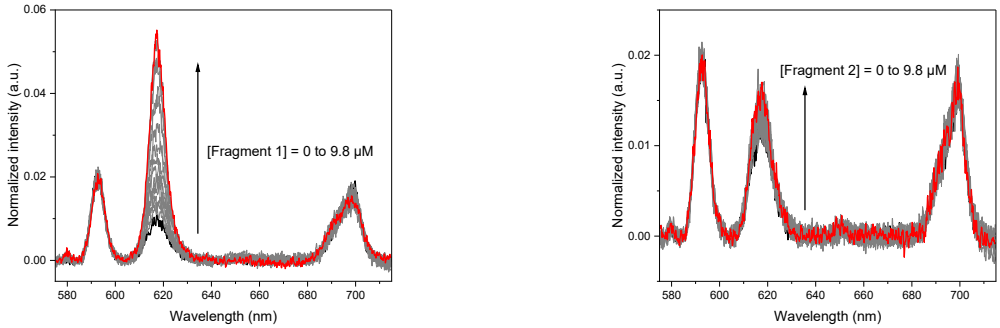


Abb. 3: TRLFS-Rohdaten für die Titration von Eu(III) mit (links) Fragment 1 (DIDGDG)) und (rechts) Fragment 2 (QVNYEE) (pH 5; λ_{ex} = 394 nm). Die gezeigten Spektren sind auf die Fläche des $^5D_0$-$^7F_1$-Übergangs (zentrale Emissionswellenlänge bei ca. 593 nm) normiert.

Tab. 1. Ergebnisse der TRLFS-Auswertung

	τ / µs	R	K_D / µM
Fragment 1	160	3,6	1,5
Fragment 2	120	1,3	

Ein Blick auf die Rohdaten der Titration (s. Abb. 3) zeigt, dass die beiden Fragmente unterschiedlich stark als Ligand mit Eu(III) wirken. Mit Zugabe von Fragment 1 ändert sich die Intensität (bzw. Fläche) des $^5D_0$-$^7F_2$-Übergangs stark, während für Fragment 2 nur eine sehr moderate Veränderung erfolgte. Durch die verkürzte Peptidlänge und die daraus resultierende Verteilung der potentiell komplexierenden Aminosäuren in den Fragmenten kann eine Bindung von zwei Lanthanoid-Ionen pro Fragment ausgeschlossen, so dass nur ein 1:1-Komplex neben den Aquoionen in der Speziation auftreten kann. Spektroskopische Kennparameter (s. Tab. 1), wie die Lumineszenzabklingzeit (τ ~ 160

µs) oder das Asymmetrie-Verhältnis (R ~ 3,6) stimmen für das Fragment 1 sehr gut mit den für das EF4-Hand Peptid gefundenen überein. Im Gegensatz dazu wurde für das Fragment 2 eine deutlich geringere Abklingzeit (τ ~ 120 µs) und ein viel kleineres Asymmetrie-Verhältnis (R ~ 1,3) gefunden, was insgesamt auf eine schlechtere Bindung hinweist. Nur für Fragment 1 wurde ein K_D-Wert bestimmt, dieser ist dem für das komplette EF4-Hand-Peptid sehr ähnlich.

Basierend auf einer empirischen Beziehung zwischen der Lumineszenzabklingzeit τ und der Anzahl an in der ersten Koordinationssphäre koordinierten Wassermolekülen zeigt sich generell, dass die Komplexe mit den bislang untersuchten Peptiden, immer noch eine größere Anzahl (ca. 5) an koordinierenden Wassermolekülen enthalten könnten – im Gegensatz z.B. zum vollständigen Calmodulin. Das bedeutet, dass die Peptide im Wesentlichen über z.B. zwei bidentate Bindungsmuster (z.B. Carboxyl-Gruppen) mit dem Ln(III)-Ion koordinieren. Interessanterweise wird danach eine vergleichbare Anzahl von Wassermolekülen durch das Fragment aus der ersten Koordinationssphäre verdrängt. D.h. für die Komplexierung von Ln(III) ist das Vorhandensein von verfügbaren/freien Carboxylat-Gruppen innerhalb der Peptid-Sequenz notwendig, endständige Carboxylat-Gruppen scheinen keine guten primären Liganden zu sein, was sich aus den Untersuchungen mit Peptid1 bzw. Peptid2 andeutet (s. Anhang, Tab. 1A). Mit z.B. Peptid5 – Peptid11 werden deutlich stabilere Komplexe gebildet. Das zunehmende Asymmetrieverhältnis R in den Emissionsspektren so wie die vergrößerte Lumineszenzabklingzeit dokumentieren die Substitution von Wassermolekülen aus der ersten Koordinationssphäre: i) OH-Oszillatoren werden verdrängt, wodurch der strahlungslose Energietransfer an Effizienz einbüßt und die Kinetik der Lumineszenz verlangsamt wird und ii) die Symmetrie am Eu(III)-Ion erniedrigt wird (von gestörter O_h-Symmetrie hin zu einer C_n-Symmetrie).

Selektivitätsuntersuchungen

Aus den oben dargestellten Eigenschaften der Komplexierung von Ln(III)-Ionen durch kurze Peptide in wässrigen Lösungen folgt eine Einschränkung hinsichtlich der Lumineszenz-basierten Detektion. Da sich in der ersten Koordinationssphäre noch 3-5 Wassermoleküle befinden, sind nur für Sm(III), Eu(III), Tb(III) und Dy(III) ausreichende Lumineszenzsignale zu erhalten. Bei den anderen Vertretern der Ln(III)-Ionen ist die H_2O-induzierte Lumineszenzlöschung zu stark.

Eine erste Bewertung bzgl. der Selektivität des EF4-Hand-Peptides erfolgte über die Bestimmung der TRLFS-basierten K_D-Werte. Es wurden die K_D-Werte für die Bindung von für Sm(III), Eu(III), Tb(III) und Dy(III) bestimmt (s. Abb 4). Für die EF4-Hand des Calmodulins wurde eine Variation des K_D-Wertes um ca. eine Größenordnung bestimmt, wobei Sm(III) als kleinstes Lanthanoid in der untersuchten Reihe den geringsten K_D-Wert zeigte.

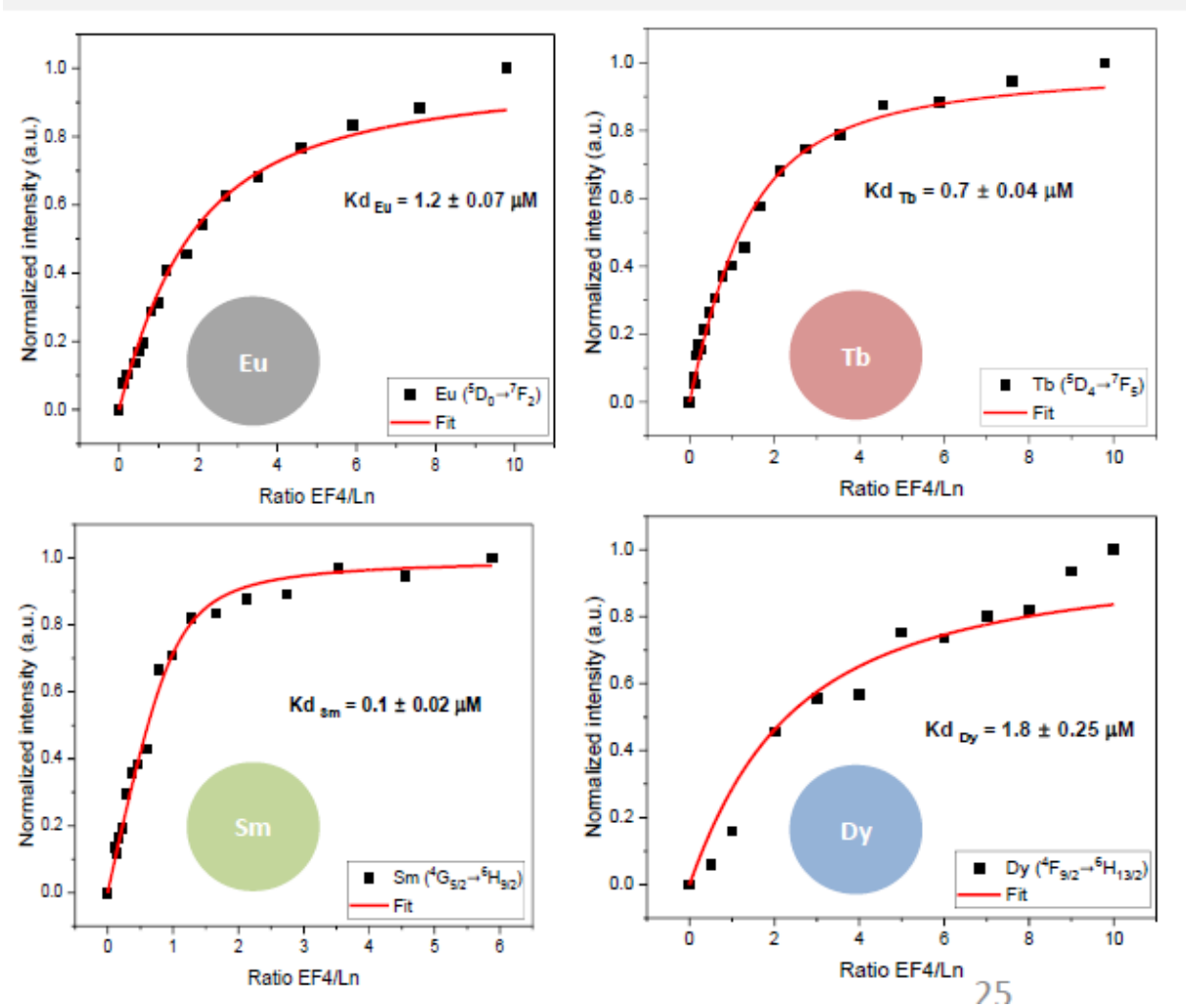


Abb. 4: Bestimmung der Bindungsaffinität des EF4-Hand Peptides des Calmodulins für Ln(III) = Eu(III), Tb(III), Sm(III) und Dy(III). Bei der Bestimmung des K_D-Wertes wurde in der Auswertung ein 1:1-Komplex im Modell hinterlegt.

Neue Peptidsequenzen als Ln(III)-Binder

Als weitere Peptide, deren Sequenzen in MD-Simulationen (Durchführung am HZDR) ermittelt wurden, wurden Peptid5 bis Peptid11 (s. Tabelle 1A, Anhang) mittels TRLFS nach etabliertem Protokoll untersucht. In den Titrationen wurde immer bis zu einem molaren Verhältnis „Eu:Peptid“ von ca. 10 gearbeitet und die jeweiligen K_D-Werte für die Annahme eines 1:1-Komplexes bestimmt. Im Vergleich zum Referenzpeptid EF4-Hand (12mer) und zu den Peptiden der ersten Generation aus MD-Simulationen (10mer), handelte es sich bei den Peptid5 – Peptid11-Peptiden um 7mere. Die bestimmten K_D-Werte variieren relativ zum Referenzpeptid EF4-Hand um ca. den Faktor 20 (K_D in µM):

EF4 (1,2) < Peptid6 (3,5) ~ Peptid7 (3,7) < Peptid10 (8,5) ~ Peptid9 (10) < Peptid11 (16,5) < Peptid8 (23)

Die Aminosäure-Sequenz von Peptid6 – Peptid11 enthält eine große Zahl von Glutaminsäure (E) und kann allgemein als E#E@EE# dargestellt werden, wobei die mit „#“ und „@“ gekennzeichneten Positionen durch Variation mit anderen Aminosäuren besetzt wurden. Wenn die Position „@“ mit Asparaginsäure (D) besetzt wurde, war die bestimmte Dissoziationskonstante K_D für die hier untersuchten MD-Peptide am geringsten (Peptid6 und Peptid7). Obwohl auch Glutaminsäure eine „freie“ Carboxylgruppe als potentielle Bindungsoption für Ln(III)-Ionen enthält, scheint diese zunächst

einmal schlechter zu sein. Allerdings ist bei der reinen Betrachtung der resultierenden K_D-Werte zu beachten, dass diese hier nur für die Bindung von Eu(III) gelistet und verglichen sind.

Neben der Variation des Ln(III) bzw. der Peptid-Länge und -Sequenz wurden Untersuchungen zum Einfluss von Parametern der Lösungsmittelchemie wie z.B. die Ionenstärke gemacht. Besonders die Anwesenheit von weiteren Kationen (+I, +II) in der Lösung auf die Komplexierung von Ln(III) durch die verschiedenen Peptide für eine spätere Anwendung wurde hinterfragt. Die Experimente zeigten, dass die Anwesenheit von einwertigen Kationen wie Kalium in einem sehr großen Überschuss toleriert wird, bei höherwertigen Ionen wie Ca(II) ist der negative Einfluss auf die Komplexierung der Ln(III) stärker. Die Experimente wurden in Form von Verdrängungstitrationen durchgeführt, in denen zu einem Komplex „Eu-Peptid“ ein weiteres Lanthanid (in der Regel La(III) oder Lu(III), weil diese einmal den kleinsten und den größten Ionenradius der Ln(III) besitzen) hinzugegeben wurden und die Freisetzung des Eu(III) bestimmt, in dem der bei Freisetzung steigende Anteil der Lumineszenz des Aquo-Ions registriert wurde (Entfaltung mittels PARAFAC). In Abbildung 5 ist die Freisetzung des Eu(III) anhand der Veränderung im Asymmetrieverhältnis R gezeigt.

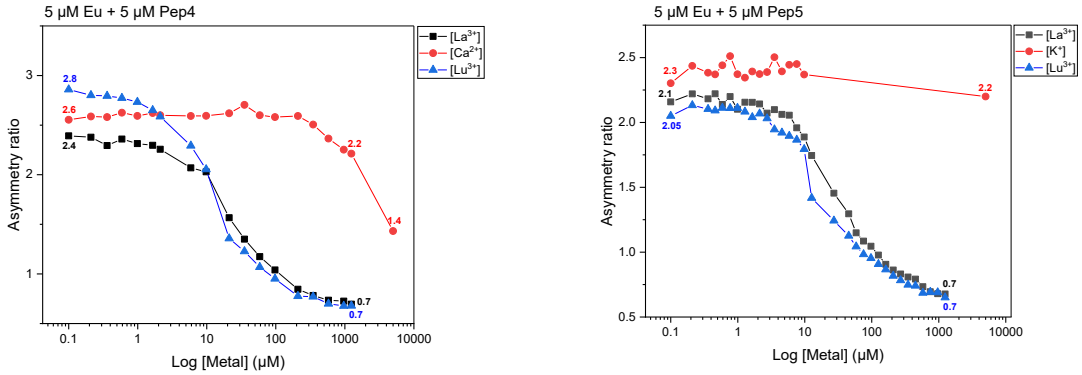


Abb. 5: Freisetzung von Eu(III) durch Zugabe von verschiedenen Kationen aus den Komplexen mit Pep4 (links) und Pep5 (rechts). Die Titrationen wurden bei pH 5 durchgeführt und die Eu(III)-Lumineszenzmessungen wurden bei λ_{ex} = 394 nm gemacht.

Etablierung der Arbeitstechniken und NMR-spektroskopische Untersuchungen am Calmodulin-EF4-Referenzsystem

In der Anfangsphase des Projekts wurden zunächst die Voraussetzungen geschaffen, um mit den Ln(III)-bindenden Peptiden detaillierte NMR-Studien durchführen zu können. Hierfür wurde das als Referenzsystem eingesetzte EF-Hand-4-Peptid (EF4) kommerziell erworben (chemische Peptidsynthese), selbst mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers hergestellt (UPPPM) sowie biotechnologisch präpariert (UPAC). Zur biotechnologischen Präparation wurde ein geeignetes Plasmid konstruiert, mit dem zunächst ein His_6-SUMO-EF-Hand-4-Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Das Fusionsprotein wurde anschließend chromatographisch gereinigt, der His_6-SUMO-Tag abgespalten und EF4 wiederum chromatographisch isoliert. Auf diese Weise konnte das EF4 in guter Ausbeute erhalten werden. Zusätzlich gelang die vollständige Isotopenmarkierung mit ^{15}N bzw. mit ^{13}C und ^{15}N. Es wurden Methoden entwickelt, um zum einen EF4 umzupuffern und um den Gehalt des chemisch synthetisierten EF4 an Trifluoressigsäure (TFA) mittels ^{19}F-NMR zu quantifizieren.

Auf Basis von 1D-, 2D- und 3D-Spektren von ^{15}N- bzw. $^{13}C/^{15}N$-EF4 wurde eine vollständige Resonanzzuordnung erhalten. Anschließend wurden NMR-Bindungsstudien mit diamagnetischen (La(III), Lu(III), Y(III)) und paramagnetischen (Sm(III), Eu(III), Ce(III), Nd(III), Yb(III), Tm(III), Er(III)) Ionen durchgeführt und im Fall der diamagnetischen Ln^{3+}-Ionen Änderungen der chemischen

Verschiebungen (CSPs) bzw. im Fall der paramagnetischen Ionen Pseudo-Kontakt-Verschiebungen (PCSs) und z.T. starke paramagnetische Linienverbreiterungen beobachtet

^{15}N-HSQC-Spektren wurden verwendet, um die Veränderungen der chemischen Verschiebungen bei Zugabe von La^{3+}-, Lu^{3+}-, Sm^{3+}- und Eu^{3+}-Ionen zu verfolgen (Abb. 6). Die Titrationen des EF-Hand 4 Peptids mit den verschiedenen Lanthanid-Ionen bestätigte die Bildung von Komplexen in 1:1- und 1:2-Stöchiometrie. Auf der Grundlage der Resonanz-Zuordnung wurden Titrationskurven für jeden Aminosäurerest erstellt und die Dissoziationskonstanten der Komplexe abgeschätzt. Da die Lanthanoid-Ionen (mit Ausnahme von La^{3+} and Lu^{3+}) paramagnetisch sind, führten die Titrationen mit Sm^{3+} und Eu^{3+} zu Signalverbreiterungen und reduzierten Intensitäten der NMR-Kreuzsignale. Im Fall von Eu^{3+} führte der stärkere paramagnetische Relaxationseffekt dazu, dass die meisten Signale bereits bei einer Konzentration von 50 µM unsichtbar wurden, wohingegen für Sm^{3+} selbst bei Konzentration bis 2000 µM kein Verschwinden von Kreuzsignalen beobachtet wurde. Bei einer Konzentration bis ca. 200 µM wurde für Sm^{3+} die Bildung des Peptid-Lanthanid-Komplexes in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 beobachtet. CSP-Studien an den Carboxylkohlenstoffen der Seitenketten deuten darauf hin, dass das erste Koordinationszentrum sich dabei in der Mitte des Peptids an der Aminosäure D5 befindet. Bei höheren Konzentrationen an Sm^{3+} tritt eine Sättigung des ersten Koordinationszentrums ein. Zusätzlich wurde die Besetzung einer zweiten Koordinationsstelle (Aminosäuren E11 und E12) beobachtet, was sich durch die Veränderung der chemischen Verschiebungen der beiden letzten Aminosäuren äußert. Die Bildung des zweiten Komplexes für La^{3+} und Lu^{3+} wurde erst bei Konzentrationen oberhalb von 1000 µM beobachtet. Dies weist auf eine höhere Dissoziationskonstante hin und ist mit den aus der Literatur bekannten Daten für den *lanthanid binding tag* (LBT) konsistent. Für Eu^{3+} wurde die sequenzspezifische Abnahme der Signalintensitäten mit zunehmender Lanthanid-Konzentration quantifiziert. Auch in diesem Fall wurde der größte Effekt für die Aminosäure D5 beobachtet. Wir gehen daher davon aus, dass die primäre Bindestelle auch im Fall von Eu^{3+} an dieser Stelle des Peptids liegt.

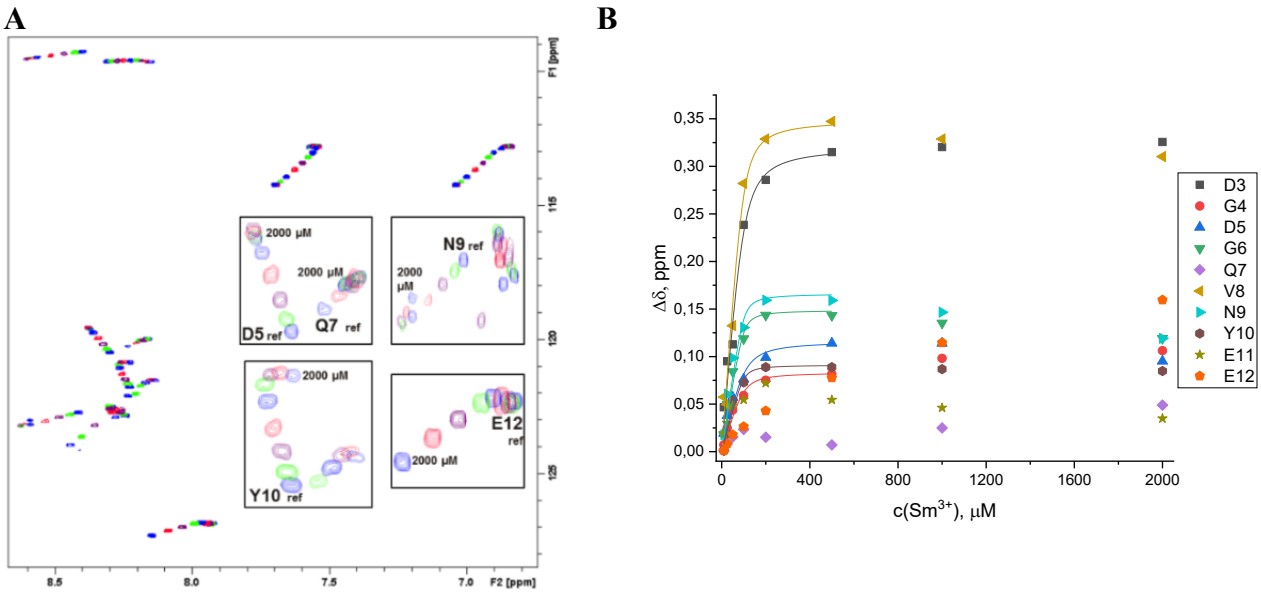


Abb. 6: (A) ^{15}N-HSQC-Titration und (B) Titrationskurven von 100 µM ^{15}N-EF-Hand 4 mit Sm^{3+}.

Eine Methodik zur Untersuchung der 3D-Struktur von Peptid-Lanthanid-Komplexen auf Basis von NMR-spektroskopischen Daten wurde etabliert. Dabei wurden internukleare Distanzen (aus NOESY), Bindungsvektor-Orientierungen (aus RDCs) und Diederwinkel (aus J-Kopplungen) einbezogen (Abb. 7). Diese Methodik wurde angewendet, um die Struktur des EF4-La^{3+}-Komplexes zu charakterisieren. Basierend auf diesen Daten wurde ein Ensemble von Strukturen erhalten. Der EF4-La^{3+}-Peptidkomplex

besitzt eine hohe Dynamik und nimmt keine spezifische Struktur ein. Dies wird nicht nur durch strukturelle Berechnungen bestätigt, sondern auch durch eine Untersuchung der Dynamik des Komplexes auf Basis des ^{1}H-^{15}N-NOEs sowie in theoretischen Simulationen der Kooperationspartner (HZD-IRE). Diese Ergebnisse haben signifikante Implikationen für das Verständnis von Struktur, Dynamik und Metallionenbindung des EF4-Hand-Peptids.

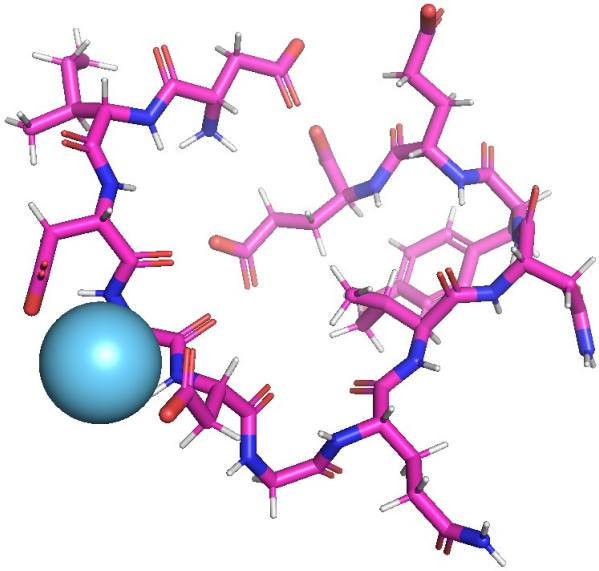


Abb. 7 . Eine der möglichen Strukturen des EF-Hand 4 Peptids mit La^{3+} mit D3 und D5 als Koordinationszentren, erhalten aus der Analyse der NMR-Spektren.

Untersuchungen an Peptid-Polymer-Konjugaten und ihren Ln(III)-Komplexen mittels NMR-Spektroskopie

Ausgehend vom Referenzpeptid EF4 wurden Peptid-Polymer-Konjugate hergestellt (UPPPM). Das Polymer-Peptid-Konjugat (YM7, EF4G-pDMA160-Konjugat) wurde detailliert mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert (Abb. 8). Im TOCSY-Spektrum zeigt sich, dass das EF4-Peptid und das Konjugat YM7 extrem ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen. Auch die Analyse internuklearer Distanzen Anhand von NOESY-Spektren ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Konjugat-YM7 und dem Modellsystem EF4.

TRLFS-Messungen zeigen einen leichten Anstieg der Affinität der Polymerkonjugate zu Ln(III)-Ionen im Vergleich zu den freien Peptiden. NMR-spektroskopisch unterscheiden sich die Ln(III)-Komplexe der Polymerkonjugate allerdings nicht signifikant von den Komplexen der unkonjugierten Peptide. Und theoretische Berechnungen weisen auf eine weiterhin hohe Flexibilität/Dynamik der Konjugaten hin. Die höhere Affinität zu Ln(III)-Ionen könnte daher auf z.B. einer veränderten Beweglichkeit des Peptides (gleichbedeutend mit einer leichten Stabilisierung der Bindungskonformation) zurückzuführen sein.

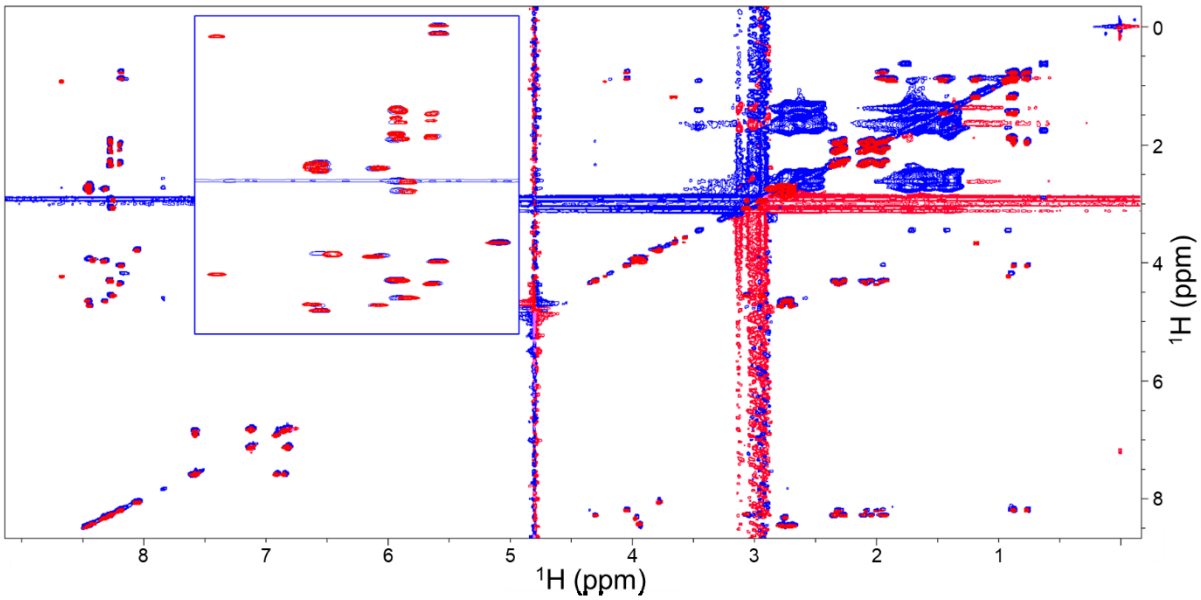


Abb. 8: Überlagerung der TOCSY-Spektren des EF4G-pDMA160-Konjugats (blau) und des freien Peptids EF4G (rot) mit vergrößertem Amidbereich der Spektren. Das EF4G-Peptid ist das EF-Hand-4-Peptid mit einem zusätzlichen G am C-terminalen Ende. Es wurde nachgewiesen, dass dies die Eigenschaften des Peptids nicht beeinflusst. Es ist deutlich zu erkennen, dass die meisten Resonanzen des EF-Hand-4G-Peptids extrem ähnlich sind.

Darüber hinaus wurden temperaturabhängige Analysen des Konjugats EF-Hand-4-pNIPAM 5 kDa durchgeführt. Bei Erwärmung auf +40 °C verbreitern sich die NMR-Signale und ihre Intensität nimmt ab. Wenn die Temperatur anschließend wieder auf Raumtemperatur gesenkt wird, kehren die Spektren jedoch in ihren ursprünglichen Zustand zurück, was darauf hindeutet, dass der Prozess vollständig reversibel ist (Abb. 9). Ein ähnliches reversibles Verhalten wurde bei langsamer Abkühlung auf 5 °C und anschließender Erwärmung auf Raumtemperatur beobachtet. Die starke Linienverbreiterung bei 40°C spiegelt die temperaturabhängige Aggregation des pNIPAMs wieder, die sich u.U. dazu ausnutzen lässt, Lanthanid-beladene Peptidkonjugate aus der Lösung auszufällen und abzutrennen.

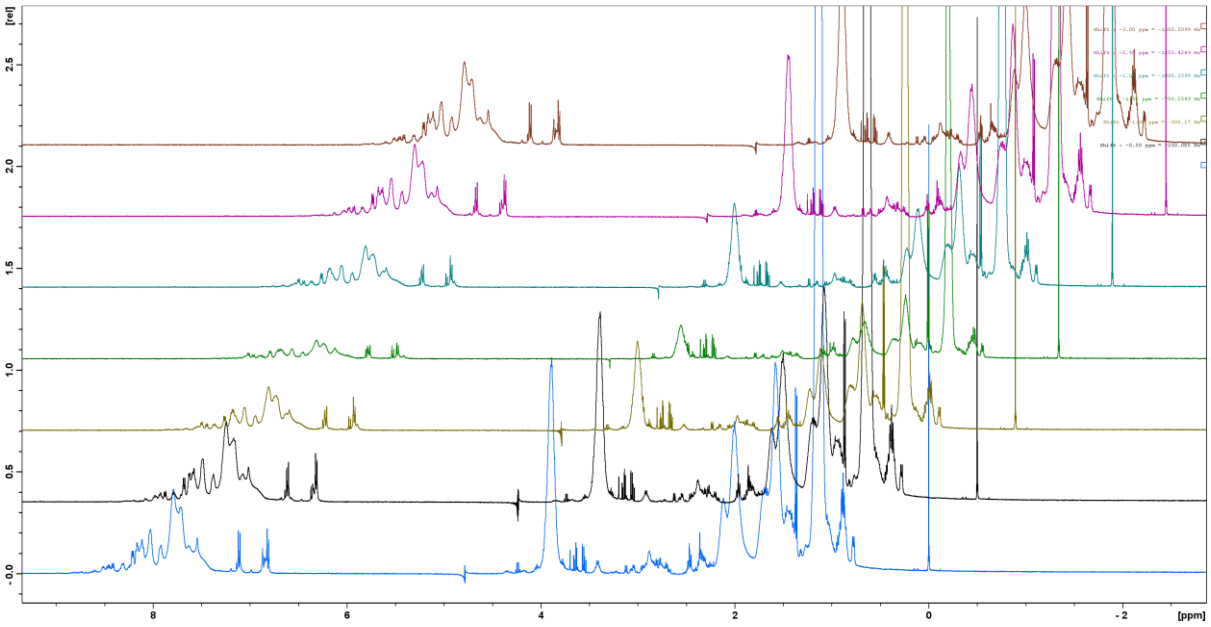


Abb. 9. 1H-Spektren des EF-Hand-4-pNIPAM-Konjugats (pNIPAM 5 kDa). Die Spektren wurden während der Erwärmung von 25 auf 40 °C und der anschließenden Abkühlung auf 25 °C in Schritten von 5 °C aufgezeichnet.

Entwicklung von Peptiden mit höherer Affinität zu Ln(III)-Ionen ausgehend von Lanmodulin-Proteinen

Wie an anderer Stelle im Detail ausgeführt ist, erfolgte die Identifikation neuer potentieller Lanthanoid-Bindesequenzen durch experimentelle und theoretische Screeningverfahren zeitverzögert, und Bindungsstudien mittel TRLFS zeigten anschließend leider keine verbesserte Bindung verglichen mit dem Referenzpeptid EF4.

In den letzten Jahren haben die sog. Lanmoduline eine beträchtliche Aufmerksamkeit erfahren, die in spezialisierten, methylotrophen Bakterien entdeckt wurden. Lanmoduline ähneln dem Calmodulin, indem sie ebenfalls vier Metallionen-bindende EF-Hände besitzen. Offenbar sind sie durch die natürliche Evolution allerdings für die Bindung von Ln(III)-Ionen optimiert worden, und für intakte Lanmodulin-Proteine wurden sub-nanomolare Affinitäten zu Ln(III) gemessen.

Zunächst haben wir uns an dem Lanmodulin aus Stamm 22A von *Methylobacterium aquaticum* orientiert und lineare Peptide der vier EF-Hände untersucht (s. Tab. 2).[1] Die Expressions-, Reinigungs- und NMR-Studientechniken, die ursprünglich für Calmodulins EF-Hand 4 entwickelt worden waren, konnten effektiv auf die Untersuchung der neuen Peptide übertragen werden.

Tab. 2 Übersicht der untersuchten Peptid-Sequenzen der zweiten Generation.

Neue Peptidsequenzen, Zweite Generation, linear	
Ma-22A-LEF1	AVDTDSDGTLDLAEVKAAA
Ma-22A-LEF2	KLEKDADGTLDAKELKG
Ma-22A-LEF3	KADPDNDGTLTKDEYVALA
Ma-22A-LEF4	AADPDNDGTLDAKEMKSPA

Basierend auf früheren Messungen, die darauf hinwiesen, dass der letzte Rest in der EF-Hand-4-Sequenz nicht an der Koordination des ursprünglichen Lanthanids beteiligt ist, während er im Protein Calmodulin als entscheidende Koordinationsstelle dient, haben wir die Länge der Sequenzen auf 17–19 Reste erweitert in der Erwartung, die Flexibilität des Peptids zu verringern, die Affinität zu Lanthanoiden zu erhöhen und eine hochaufgelöste Strukturbestimmung des Peptid-Ln(III)-Komplexes zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden Titrationen mit den drei Lanthanoiden La^{3+}, Lu^{3+} und Sm^{3+} durchgeführt und $^{1}H,^{15}N$-HSQC-Experimente für alle Proben aufgenommen (s. Tab. 3). Eine bemerkenswerte Beobachtung war die Korrelation zwischen Sequenzlänge und Lanthanoidaffinität; längere Sequenzen zeigten tendenziell eine höhere Affinität. Beispielsweise ist die Affinität des Peptids Ma-22A-LEF3 für La^{3+} fünfmal höher als für das ursprüngliche EF-Hand-4-Peptid (K_D = 20 µM bzw. 119 µM). Trotz dieser erhöhten Affinität behielten die resultierenden Peptide jedoch eine beträchtliche Flexibilität und weisen weiterhin keine definierte Struktur auf, obwohl sie anhand von Messungen des heteronuklearen $^{1}H,^{15}N$-NOEs rigider sind als das EF4 Referenzpeptid. Für eine effiziente Lanthanid-Extraktion wären diese Strukturen vermutlich nicht ausreichend.

Tab. 3 K_D-Werte verschiedener Peptide zu Ln(III)-Ionen.

	K_D, µM			
	La^{3+}	Lu^{3+}	Sm^{3+}	
EF-hand 4	119±4	49±2	49.9±0.1	1287±4
Ma-22A-LEF2	109.1±1.3	130.7±1.7	-	
Ma-22A-LEF3	18.5±5	2.69±0.18	0.32±0.03	
Ma-22A-LEF4	-	4.88±0.56	0.94±0.25	

[1] Fujitani et al. Front. Microbiol. 2022, 13, 921636. doi: 10.3389/fmicb.2022.921636

Design und Herstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten

Peptid-Polymer-Konjugate dienten als Modellsystem, um die Bindung von Ln-Ionen im Vergleich zu unmodifizierten Peptiden charakterisieren zu können. Die Peptide wurden dafür mit dem eigenen Peptid-Synthetisierer hergestellt. Dies bietet den Vorteil, dass eine Funktionalisierung der Peptide möglich ist, wenn sie noch auf dem Harz gebunden sind. So können z.B. funktionale Gruppen für die Polymersynthese direkt an den N-Terminus der Peptide gebunden werden und die funktionalisierten Peptide erst nach Reinigung (Waschen zum Entfernen des Überschusses der anzubindenden Gruppen) abgespalten werden. EF-Hand Peptide sowie Peptidfragmente wurden über Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Dabei wurden zunächst die Reaktionsparameter und Reinigungsprotokolle optimiert und eine Reihe verschiedener Festphasenharze zur Generierung von Peptiden mit und ohne Schutzgruppen in den Aminosäureresten sowie C-terminalen Carbonsäureamiden getestet. Mit einem auf Polystyrol basierenden Festphasenharz mit Chlor-trityl Linker konnten die Nebenprodukte der Peptidsynthese auf ein Minimum reduziert und die Reinheit des EF4 Peptids auf bis zu 95% erhöht werden. Dieses Harz ist aus Gründen der Lagerungsstabilität bereits mit der Aminosäure Glycin (Gly) vorbeladen. Alle mit diesem Harz hergestellten Peptide besitzen entsprechend ein zusätzliches Glycin am C-Terminus (Beispiel: EF4-Gly).

Die Reinheitskontrolle und ggf. Reinigung der Peptide erfolgte über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Mit der Verwendung einer Ammoniumcarbonat-Lösung pH 8 als wässrige Phase konnte eine gute Auflösung und Trennung der Analyten erreicht werden. Über massenspektrometrische Analyse wurde anschließend die Synthese der gewünschten EF-Hand Peptide bestätigt.

Um die Herstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten über Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs- (RAFT)-Polymerisation zu ermöglichen, wurde über eine zweistufige Synthese ein Trithiocarbonat Kettentransfer-Reagenz (CTA, *engl.* für chain transfer agent) hergestellt, welches bereits in Zusammenhang mit Peptid-Makroinitiatoren erprobt wurde und für eine breite Reihe von relevanten Acrylat-, Methacrylat-, Acrylamid- und Methacrylamid-Monomeren geeignet ist. Die direkte Anbindung des CTAs an das peptidbeladene Festphasenharz wurde unter Verwendung von HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) als Aktivierungsreagenz und N-Methylmorpholin (NMM) als Base durchgeführt (Abb. 13). Der erhaltene macro-CTA (CTA-EF4G) wurde charakterisiert und für Polymerisationsreaktionen nach der *grafting-from* Technik verwendet. Für erste Ansätze der RAFT-Polymerisation wurde *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) als Monomer verwendet. DMA gilt als leicht polymerisierbar. Aufgrund der hervorragenden Lösungseigenschaften wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet und 0,1 Äq. Azobis(isobutyronitril) (AIBN) als Radikalstarter. Alle Reaktanden wurden in einen Schlenkkolben gegeben und entgast. Das Gemisch wurde anschließend für 24 Stunden auf 65 °C erwärmt. Hierbei wurde eine annähernd quantitative Umsetzung des Monomers von 96 % beobachtet. Die Aufreinigung der Peptid-Polymer-Konjugate erfolgte durch Dialyse gegen Wasser in einem Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose. Die Konjugate wurde mittels NMR-Spektroskopie (Abb. 13) und Gelpermeationschromatographie (GPC) charakterisiert. Die durch NMR-Spektroskopie und GPC ermittelten Werte für die zahlengemittelte Molmasse M_n stimmten gut überein. Die Dispersität, also die Molmassenverteilung des Konjugates, lag mit 1,2 im monodispersen Bereich, und deutete somit auf eine kontrollierte Polymerisation ohne Nebenreaktionen hin.

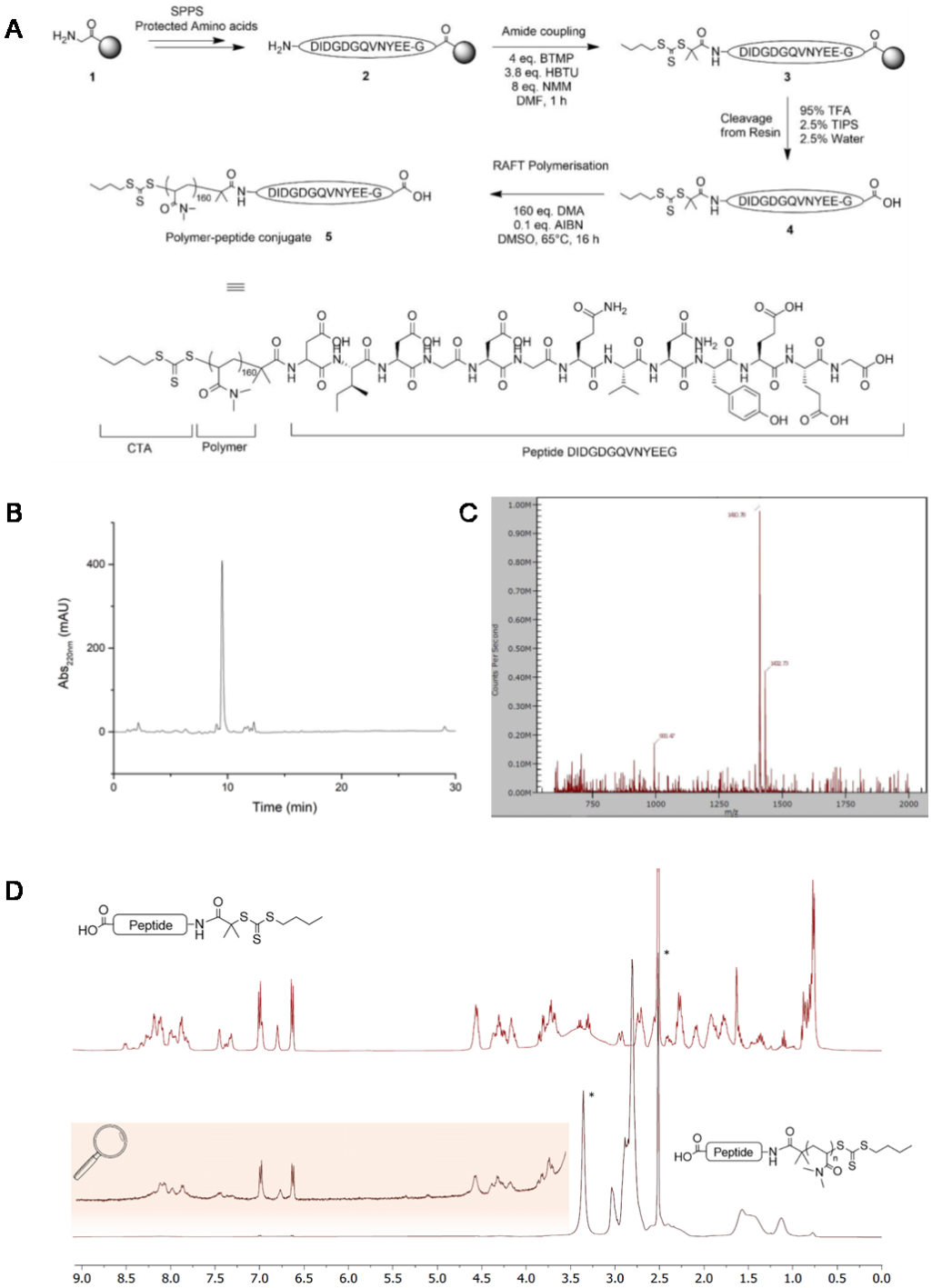


Abb. 13: Schema der Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten am Beispiel von $pDMA_{160}$-EF4G (A). HPLC-Chromatogramm (B) und Elektrosprayionisations (ESI)-Massenspektrum (C) von EF4G. ^{1}H-NMR Spektrum von CTA-EF4G in d_6-DMSO (D, oben) und dem Polymerkonjugat $pDMA_{160}$-EF4G (D, unten). Im Tieffeld zwischen 9 und 6,5 ppm sind die Signale der Peptidbindungen sowie der aromatischen Aminosäure Tyrosin zu sehen, welche im Polymerkonjugat erhalten bleiben. Im unteren Spektrum zwischen 3,3 und 1 ppm sind zusätzlich die Signale des DMA Polymers erkennbar.

Anschließend wurde mit dem macro-CTA eine Reihe verschiedener hydrophiler und hydrophober Polymere hergestellt. Als wasserunlösliche Monomere wurden Styrol und Benzylacrylat (BA) verwendet. Mit Styrol ließ sich eine Reihe von unlöslichen Peptid-Polymer-Konjugaten unterschiedlicher Größe mit moderatem Monomerumsatz von bis zu 60% und guter Dispersität (Đ 1,1-1,2) herstellen. Interessanterweise bildeten einige Konjugate nach langsamer Dialyse aus Dimethylsulfoxid (DMSO) gegen Wasser partikuläre geordnete Nanostrukturen. Eine Analyse via

Dynamischer Lichtstreuung (DLS) von Konjugaten mit einer Polymerlänge von ca. 70 Monomereinheiten zeigte das Vorliegen von Nanopartikeln mit einer Größe von 19,6 nm (Abb. 14). Vermutlich handelt es sich hierbei um „crew-cut“ Mizellen bei denen das hydrophobe poly-Styrol den Kern bildet und die hydrophilen EF4-Peptide an der Oberfläche präsentiert sind. Leider konnte die Assemblierung dieser Nanostrukturen nicht durchgehend reproduziert werden.

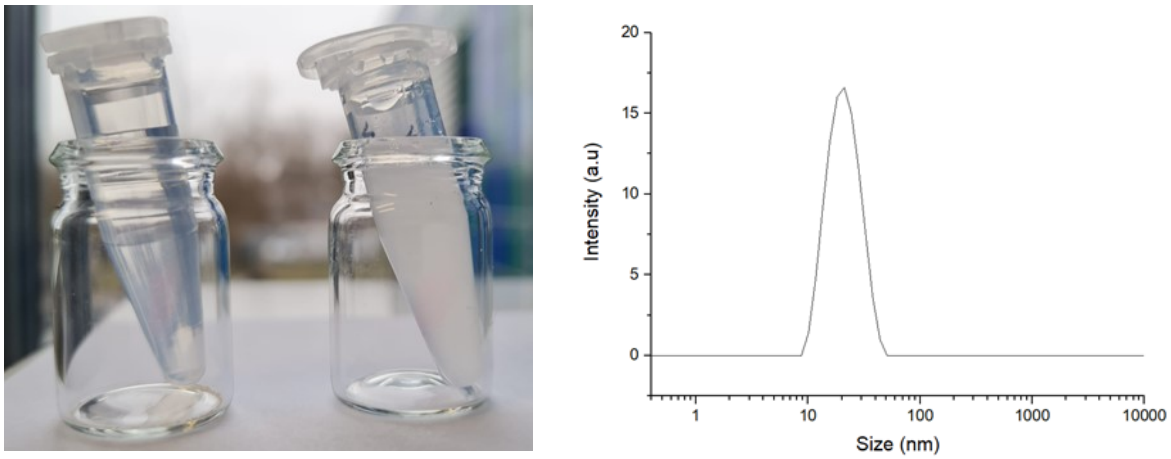


Abb. 14: 1 mg/ml pStyrol$_{70}$-EF4G- aus DMSO gegen Wasser dialysiert (linkes Bild, links). Dispersion von 1 mg/ml pStyrol$_{70}$-EF4G in Wasser (linkes Bild, rechts). DLS Größenverteilung von pStyrol$_{70}$-EF4G Nanostrukturen (rechts).

Neben dem bereits erprobten DMA wurden als wasserlösliche Monomere weiterhin 4-Acryloylmorpholin (NAM) und Oligo(ethylenglycol)methyletheracrylat (OEGA) getestet. Darüber hinaus wurde *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM) verwendet, welches thermoresponsive Polymere bildet. Bis auf Konjugate mit OEGA ließen sich hier alle Monomere gut polymerisieren. Für eine systematische Analyse wurde eine Konjugat-Bibliothek mit DMA, NAM und NIPAM und Polymermassen von 5 000 Da, 15 000 Da und 30 000 Da hergestellt (Abb. 15). Die Analyse via GPC ergab hierbei eine durchweg kontrollierte Reaktion mit niedrigen Dispersitäten von 1,2-1,3.

No.	Monomer	Conversion (%)	Mn (NMR)
C1	DMA	95	6.4
C2		95	15.9
C3		90	28.6
C4	NAM	74	5.3
C5		93	21.5
C6		97	43.1
C7	NIPAM	85	6.5
C8		84	14.0
C9		91	17.2
C10		76	27.7
C11	Styrene	9	4.3
C12		37	7.8
C13		34	7.1
C14		31	16.1
C15	BA	95	30.2

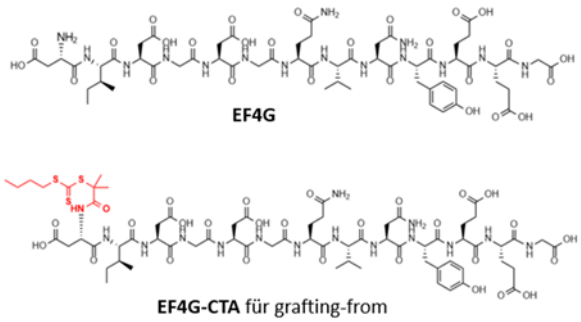


Abb. 15: Links, tabellierte Konjugatbibliothek mit verschiedenen Polymeren. Diese wurden mit CTA-EF4G für grafting-from erhalten. Rechts, Strukturen des Peptids EF4G sowie dessen funktionalisierte Variante für grafting-from.

Charakterisierung von Peptid-Polymer-Konjugaten mittels TRLFS

Bei den Polymeren wurden verschiedene molaren Massen (ungefähr 5 kDa und 30 kDa) eingesetzt: DMA, NAM und NIPAM, wobei das NIPAM-Polymer ein thermoresponsives Verhalten zeigt, welches

potentiell als ein Trigger-Schema für die gezielte Freisetzung der Lanthanide vom geplanten Filtermodul genutzt werden könnte, neben dem bereits getesteten pH-Sprung.

In Tabelle xx ist eine Übersicht von mittels TRLFS untersuchten Peptid-Polymer-Konjugaten (Struktur s. Tabelle 1A) mit ihren zentralen photophysikalischen Kenngrößen sowie den K_D-Werten zusammengefasst. Daneben wurden weitere Konjugate bzw. Polymere ohne Peptid untersucht, um z.B. unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen (s. Abb. 16). Analog zum isolierten EF4-Hand Peptid wurde Eu(III) durch die Konjugate gebunden, was sich an Hand der veränderten spektralen Intensitätsverteilung, der Zunahme der Lumineszenzintensität sowie der Lumineszenzabklingzeit ableiten lässt (s. Abb. 16 und Tabelle xx). Die für die Kopplung eingeführte zusätzliche Aminosäure (AS) Glycin (Gly) hat keinen Einfluss auf die Bindung, denn es wurden für die photophysikalischen Parameter und K_D-Werte gleiche Werte gefunden. Weiterhin wurde die Art der Kopplung und deren Einfluss auf die Komplexbildung betrachtet.

Tab. 7 Zusammenstellung der photophysikalischen Daten und K_D-Werte für die untersuchten Peptid-Polymer-Konjugate. Der Zusatz EF4G bedeutet das die Peptidsequenz zum Zweck der Polymerankopplung um die AS Gly erweitert wurde

Peptid-Polymer-Konjugat	Asymmetrie R	Lumineszenz-abklingzeit τ / µs	Anzahl H2O-Moleküle n	K_D / µM
DMA5-EF4G	5,3 ± 0,1	248 ± 3	3-4	0,8 ± 0,3
NAM5-EF4G	4,6 ± 0,1	223 ± 3	3-4	0,1 ± 0,2
NIPAM5-EF4G	4,0 ± 0,1	208 ± 2	4-5	1,9 ± 0,7
DMA30-EF4G	4,9 ± 0,3	245 ± 5	3-4	0,7 ± 0,3
NAM30-EF4G	5,1 ± 0,1	241 ± 3	3-4	0,5 ± 0,4
NIPAM30-EF4G	5,0 ± 0,3	245 ± 14	3-4	0,8 ± 0,4

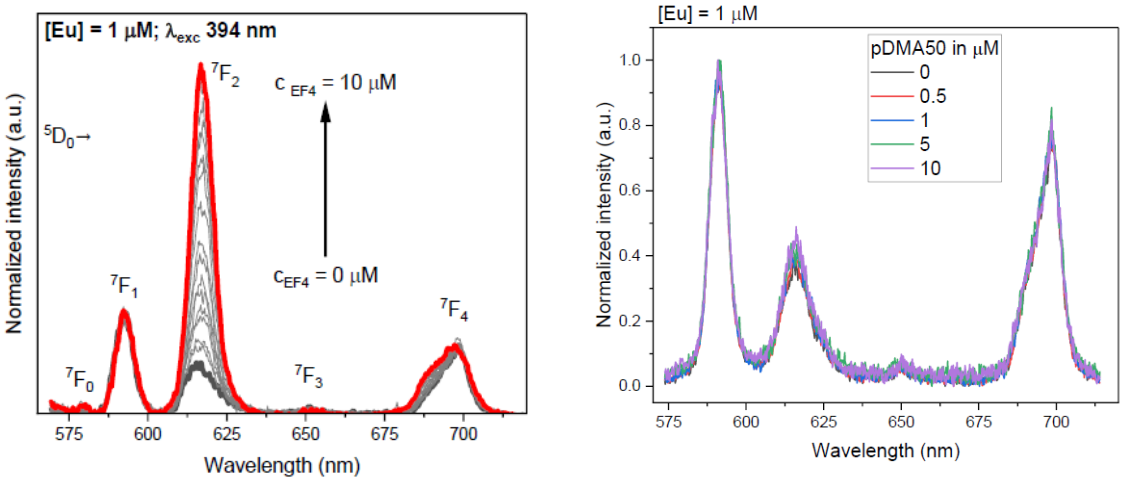


Abb. 16: Vergleich der Komplexierung von Eu(III) durch EF4 (links) und das Polymer pDMA50 (rechts). Im Gegensatz zu EF4 hat das Polymer keinen sichtbaren Einfluss auf die spektrale Intensitätsverteilung oder die Emissionsintensität. Es wird daher angenommen werden, dass das Polymer pDMA50 Eu(III) nicht komplexiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass es hier einen deutlichen Effekt gibt basierend auf den stark unterschiedlichen photophysikalischen Parametern der jeweiligen Komplexe. Es wurde eine generelle Absenkung der Dissoziationskonstanten von ca. 50% im Vergleich zum EF4-Hand-Peptid gefunden, wobei die DMA- und NAM-Konjugate etwas geringere K_D-Werte ergaben und die molare Masse des Polymers (5 kDa vs. 30 kDa) ebenfalls einen geringen positiven Effekt zeigt.

Die diskutierten Varianten in der Stöchiometrie von Peptid-zu-Ln(III) sind nur für die kurzkettigen Peptide relevant. Im Falle der Peptid-Polymer-Konjugate (s. Tab. 7) wurden in den TRLFS-Experimenten keine Hinweise auf die Bildung von 2:1- oder 1:2-Komplexen im untersuchten Konzentrationsbereich beider Partner gefunden. Hier scheint die Polymerkette die Bildung von Komplexen mit von 1:1 abweichender Stöchiometrie zu verhindern. Dies ist vermutlich durch eine sterische Hinderung zu begründen, denn einen Hinweis auf eine direkte Komplexierung durch das Polymerfragment konnte in keinem der untersuchen Fälle nachgewiesen werden (hierzu wurden die Polymere ohne Peptid entsprechend eingesetzt).

Die Lumineszenzleitparameter der Peptid-Polymer-Konjugate wie z.B. das Asymmetrie-Verhältnis (R ~ 4 -5) und die Lumineszenzabklingzeit (τ ~ 220 - 250 µs) (s. Tab. 7) zeigen, dass der Eu(III)-Komplex im Vergleich zum EF4-Hand-Peptid deutlich verschieden ist. So sind hier noch ca. 4 Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre des Eu^{3+} Ions verblieben und auch die Bindungen sind in ihrer Elektronenverteilung stärker polarisiert (R-Wert). Diese vorläufigen Ergebnisse stützen unsere Arbeitshypothese, dass durch das Polymer ein Synergie-Effekt erreicht werden kann, in dem es als eine Art Rückgrat fungiert, das die Konformation des Peptides (oder des Peptid-Ln(III)-Komplexes), welche ursprünglich (kinetisch) instabil zu sein schein, vorstrukturiert bzw. stabilisiert, woraus eine stärkere Wechselwirkung (geringerer K_D-Wert) mit den Lanthaniden resultiert. Die in TRLFS-Experimenten gefundene Verbesserung der Komplexierung ist für die untersuchten Polymere vergleichbar gut. Zu den möglichen molekulare(n) Ursache(n) kann außerdem noch eine Abschirmung gegenüber Wassermolekülen (bzw. eine Verminderung der Austauschgeschwindigkeit von Wassermolekülen innerhalb der ersten Koordinationssphäre) in Betracht gezogen werden, die dann auch wieder hauptsächlich auf einer sterischen Abschirmung beruhen dürfte.

Matrix Selektion, Immobilisierung und Charakterisierung

Als erste Immobilisierungsmatrix wurden quervernetzte Polystyrol (PS)-basierte Harze verwendet, die in der Festphasenpeptidsynthese eine breite Anwendung finden. Entsprechend einer konventionellen SPPS wurde das EF4G-Peptid durch schrittweise Anbindung der Aminosäuren auf einem „Tentagel"-Harz, einem hydrophilen PS Harz mit aufgepfropftem Polyethylenglykol, hergestellt. Nach der Synthese wurde das Peptid jedoch nicht von dem Harz abgespalten, sondern nur die Schutzgruppen entfernt. Dies ist durch die Einbindung des basenlabilen Linkers HMBA (4-(Hydroxymethyl)benzoesäure) möglich, welcher unter den sauren Bedingungen der Schutzgruppenabspaltung stabil bleibt. Die Beladungsdichte des Harzes mit Peptid wurde mittels Abspaltung der N-terminalen Fmoc Schutzgruppe mit Piperidin zu 177,7 µmol/g bestimmt.

Mit den EF4G-modifizierten Harzen wurde die Extraktion von Samarium untersucht. Dazu wurden die Peptid-funktionalisierten Harze mit äquimolaren Mengen Sm^{3+} bei pH 6 inkubiert (100 µM EF4G: 100 µM $SmCl_3$) und über 24 Stunden geschüttelt. Nach Zentrifugieren wurde die Samarium-Konzentration im Überstand mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) bestimmt. Ca. 88 % Sm^{3+} wurden an die Peptid-Polymer-Partikel gebunden (Abb. 17). Durch Zugabe von 1 M HNO_3 konnte das gebundene Samarium nahezu quantitativ (99 %) von den Partikeln wieder gelöst werden. Dagegen zeigte das Harz mit immobilisiertem EF4G, dessen Aminosäurereste aber noch ihre Schutzgruppen trugen, keine Bindung von Sm^{3+}.

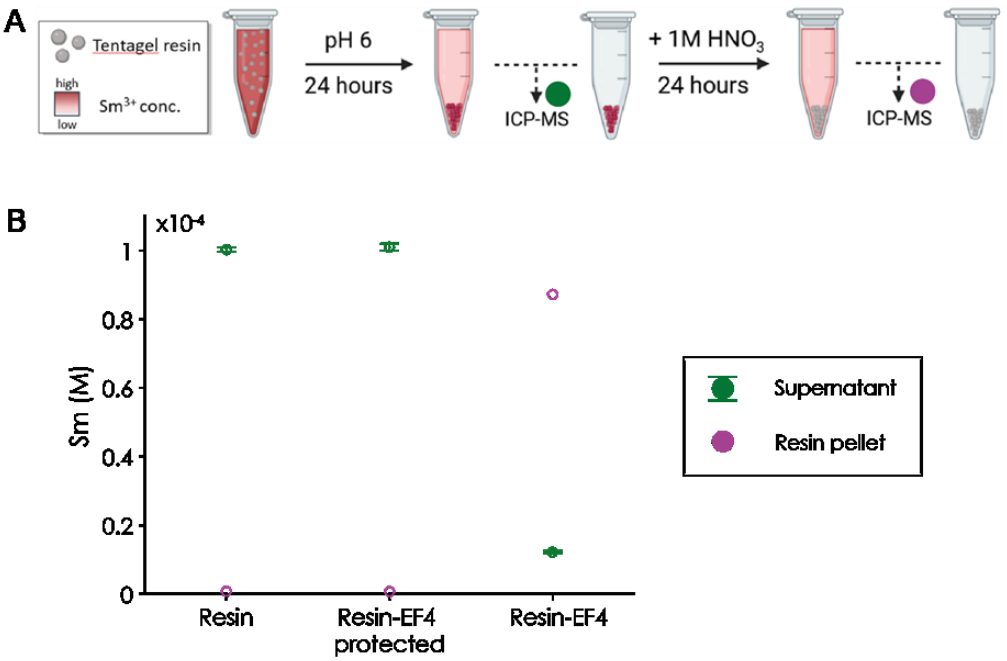


Abb. 17: Extraktion von Samariumionen mit immobilisiertem EF4G-Peptid (A). Das funktionalisierte Harz wurde 24 Stunden lang bei einem pH-Wert von 6 mit Sm^{3+} inkubiert. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand mit deutlich reduzierter Metallionenkonzentration entfernt und mittels ICP-MS analysiert. Das an das Harz gebundene Sm^{3+} konnte durch Ansäuern mit 1 M HNO_3 zurückgewonnen werden. Die Samariumkonzentration wird durch eine rote Färbung visualisiert (Bild wurde mit Biorender erstellt). ICP-MS Analyse der Samariumbindung an verschiedene Harztypen (B).

Weiterhin wurden Polymerpartikel synthetisiert, die funktionale Gruppen auf ihrer Oberfläche tragen, die eine direkte Immobilisierung von Peptiden über ihren N-Terminus ermöglichen. Die Partikel werden durch Copolymerisation von Styrol und Maleinsäureanhydrid hergestellt. Ihr hydrophober Polystyrol-Kern ist von einer hohen Anzahl reaktiver Anhydride umgeben, die unkatalysiert mit Aminen reagieren. Entsprechend können Partikel und Peptide zusammen inkubiert werden und es bildet sich durch Ringöffnung der Anhydride eine Amidbindung mit dem Peptid N-Terminus aus. Da sich EF4 und Fragment 1 dieses Peptids kaum in ihren Affinitäten zu Lanthanidionen unterscheiden (Dissoziationskonstanten für Eu^{3+} sehr ähnlich, siehe TRLFS-Messungen), wurde die entsprechende Sequenz (GDIDGDG, mit einem zusätzlichen Glycin als Abstandshalter) für die Immobilisierung verwendet. Die Synthese dieser immobilisierten Peptide vereint also mehrere Vorteile: einfache und kostengünstige Partikelsynthese mit großer Variabilität hinsichtlich Größe der Partikel, kürzestmögliche Peptidsequenz zur effizienten Bindung von Lanthanidionen und einfache Immobilisierungsreaktion bei Raumtemperatur ohne Einsatz weiterer Chemikalien. Die Dichte der Anhydridgruppen auf den Partikeln wurde mit 3,2 mmol pro Gramm Partikel bestimmt. Innerhalb von 2 h leichtem Schütteln konnten 398 mg GDIDGDG pro Gramm Partikel immobilisiert werden, was 80 % der Peptide aus der Ausgangslösung entspricht. FTIR-Spektren zeigten eine Verringerung der Intensität der Anhydrid-Banden, während eine neue Amid-Schwingungsbande (1540 cm^{-1}) entstand (Abb. 18).

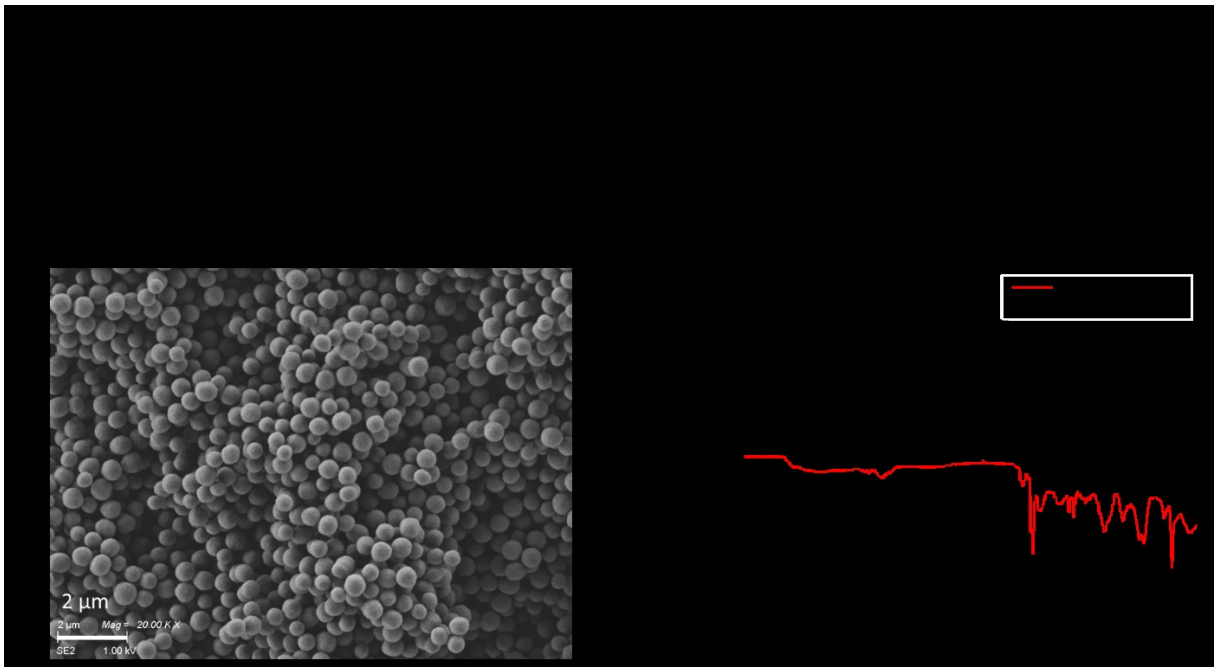


Abb. 18: Immobilisierung von G-EF4-Fragment 1 (GDIDGDG) auf Polystyrolpartikeln. Syntheseschema der Polymer-Partikelsynthese und Peptid-Immobilisierung (A). Rasterelektronen-Mikroskopie (SEM)-Bild der Polystyrol-Anhydrid-Partikel (B). FTIR-Spektren der Partikel vor und nach Immobilisierung des Peptids (C).

Freisetzung und Wiederverwendung des Biohybrid-Filters

Mit dem wasserlöslichen auf *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) basierenden Konjugat pDMA30kDa-EF4G wurde eine alternative Strategie zur Extraktion von Lanthaniden erprobt. Dabei wurde das Konjugat in einen Dialysebeutel gegeben und in eine Lösung von Terbium(III)chlorid getaucht (Abb. 19). Die Membran ermöglicht eine Diffusion von Metallionen in das Innere des Beutels, hält jedoch aufgrund der geringen Porengröße das Peptid-Polymer-Konjugat zurück (MWCO 16 kDa). Die Terbium Konzentration der Lösung wurde anschließend kolorimetrisch mithilfe von Xylenolorange bestimmt. Die quantitative Adsorption von Terbium-Ionen konnte nach 240 Minuten beobachtet werden. Nach Ansäuerung der Lösung mit konzentrierter Salzsäure (aq. HCl) auf 20 mM konnten die Metallionen wieder vollständig desorbiert werden. Dieser Ansatz stellt eine vielversprechende Alternative zur partikelbasierten Extraktion dar. So wäre eine Platzierung solcher Dialysebeutel in kontaminierten Gewässern denkbar, um Lanthanide über längere Zeiträume akkumulieren zu können.

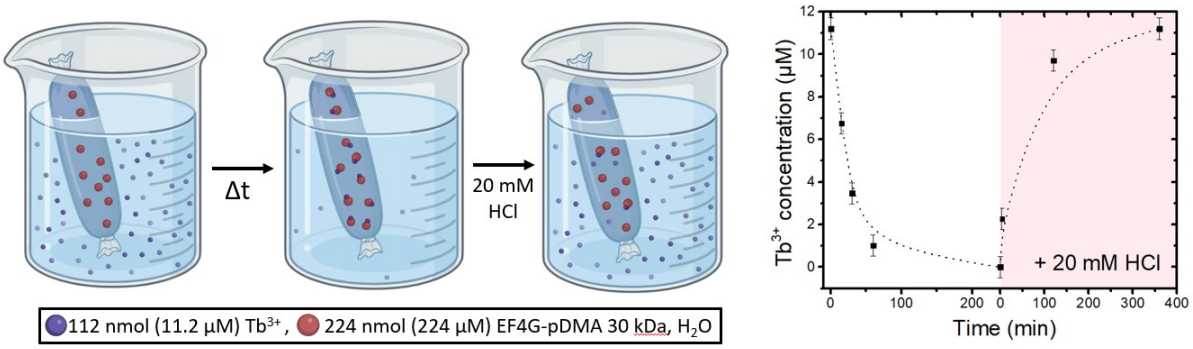


Abb. 19: Links, Extraktion von Terbium durch Konjugat pDMA30kDa-EF4G in einem Dialysebeutel. Rechts, zeitabhängige Adsorption und durch Ansäuerung hervorgerufene Desoption von Terbium-Ionen.

Die thermoresponsiven Eigenschaften der auf pNIPAM basierenden Konjugate pNIPAM5kDa-EF4G, pNIPAM15kDa-EF4G und pNIPAM30kDa-EF4Gwurden weiter über Turbidimetrie untersucht. In diesem Verfahren wird die Trübung, also die Abnahme der Lichtintensität, einer gelösten wässrigen Probe gemessen. Die Konjugate zeigen hier ein besonders interessantes Temperatur-, Metal- und pH-responsives Verhalten. Das Homopolymer pNIPAM besitzt, je nach Polymerlänge, eine untere kritische Lösungstemperatur von ca. 32°C. Bei dieser Temperatur kollabiert die Polymerkette, aus dem Komplex wird Wasser abgestoßen und das Polymer wird unlöslich. Dies wird an einer Erhöhung der Trübung ersichtlich. Das Konjugat pNIPAM30kDa-EF4G zeigt ein ähnliches Verhalten, wobei der Phasenübergang in deionisiertem Wasser bei cirka 38°C erfolgt. Die Zugabe von Natrium- oder Calcium-Ionen hat hierbei keinen Einfluss auf das Trübungsverhalten (Abb. 20, Mitte). Interessanterweise lässt sich durch Zugabe von Terbium-Ionen oberhalb des Trübungspunktes die Trübung weiter erhöhen, es erfolgt eine Aggregation der Polymerketten und schließlich ab einer Konzentration von 0,5 mM eine Niederschlagsbildung (Abb. 20). Dies lässt sich als durch Metallbindung hervorgerufene Destabiliserung des Peptid-Polymer-Konjugats erklären. Das Peptid ist bei neutralem pH vollständig deprotoniert. Die Ladungen helfen dabei, den hydrophoben Polymerteil zu stabilisieren. Komplexiert nun das Peptid ein Metallkation, werden die negativen Ladungen ausgeglichen, wodurch eine Destabilisierung und folglich eine Aggregation hervorgerufen wird. Dieses Phänomen, auch Thermopräzipitation genannt, könnte eine interessante Alternative zur Extraktion von Lanthaniden darstellen.

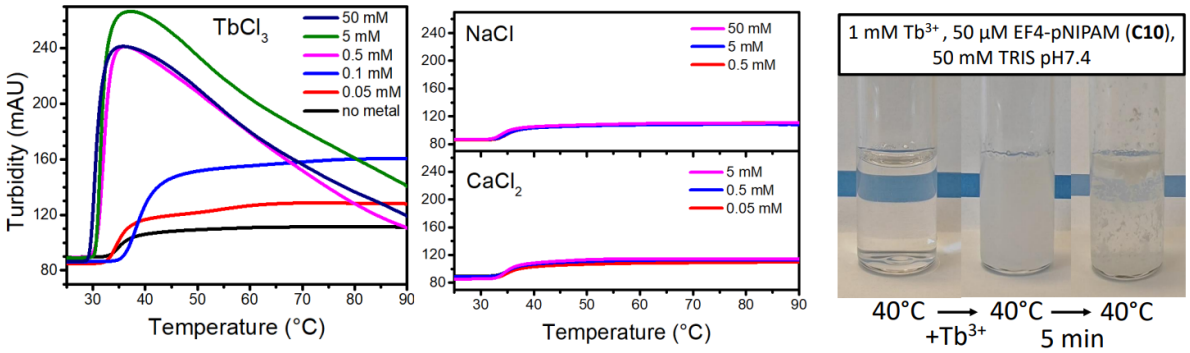


Abb. 20: Links, turbidimetrische Messung von 50 µM pNIPAM30kDa-EF4G mit unterschiedlicher Terbium-Konzentration. Mitte, Einfluss von Natrium- und Kalzium-Ionen auf das Trübungsverhalten. Rechts, Fällung des Peptid-Polymer-Konjugats durch Zugabe von Terbium-Ionen bei 40°C.

Die Selektivität der verschiedenen Peptid-Polymer Konjugate hinsichtlich Tb(III) und Eu(III) wurde mittles ICP-OES untersucht. Dazu wurde eine Mischung aus jeweils 20 µM Tb(III) und 20 µM Eu(III) mit 50 µM Peptid oder Peptid-Polymer Konjugat inkubiert. Ungebundene Ionen wurden anschließend über zentrifugale Filtration abgetrennt und über ICP-OES quantifiziert (Abb. 21). Während die Peptide EF4G und NAc-EF4G (acetylierter N-Terminus) nur etwa 65% der gesamten Ionen binden konnten, zeigten die Polymer-Konjugate eine verbesserte Affinität mit bis zu 76% gebundener Ionen. Sowohl Peptide als auch Konjugate zeigten eine durchweg höhere Selektivität zu Tb im Vergleich zu Eu. Interessant ist hier, dass die Polymer-Konjugate eine höhere Selektivität zu Tb aufweisen als die unmodifizierten Peptide. Wird die Inkubation mit dem thermoresponsiven Konjugat pNIPAM-EF4G bei 40°C durchgeführt, lässt sich die Selektivität weiter zu Gunsten von Tb modulieren.

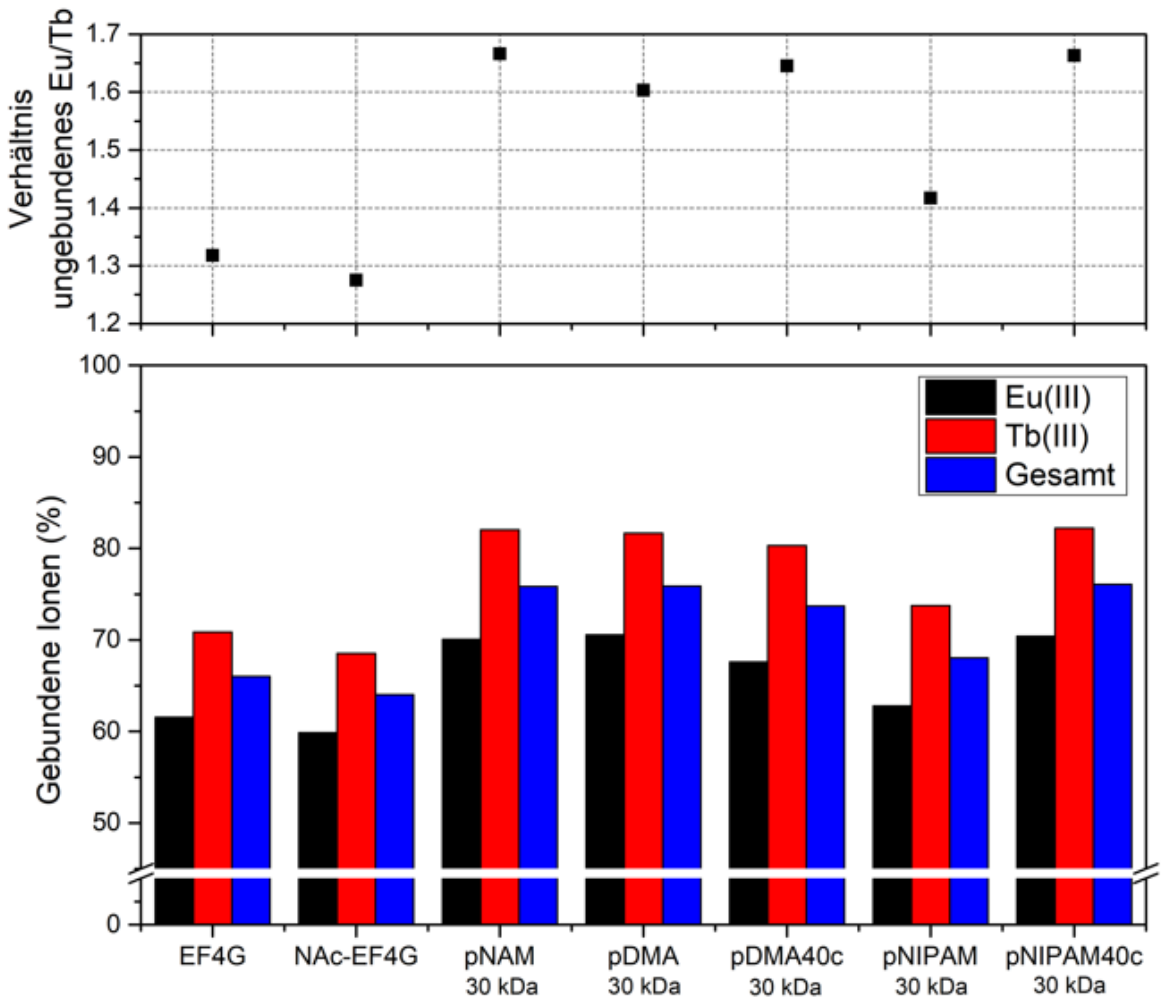


Abb. 21: Durch ICP-OES bestimmter Anteil an Eu^{3+} und Tb^{3+}, der aus äquimolarer Lösung an Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate gebunden wird (unten) sowie Verhältnis von ungebundenem Eu^{3+} zu Tb^{3+} (oben).

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalkosten

Die thematischen Aufgabengebiete hatten die Schwerpunkte NMR-Untersuchungen, TRLFS-Untersuchungen und Herstellung von Peptiden bzw. Peptid-Polymer-Konjugaten. Umfang und Anforderungsprofil der jeweiligen Tätigkeiten in diesen Aufgabengebieten erforderte daher jeweils eine:n Wissenschaftler:In und rechtfertigt die Anstellung von drei Doktorand:Innen. Durch die zuwendungsneutrale Verlängerung war es notwendig, die Personalkosten für die drei Doktorand:Innen zum Teil aus anderen Kostenarten auszugleichen (Rücksprache mit Projektträger war erfolgt).

Materialkosten

Für die Durchführung der experimentellen Arbeiten waren Chemikalien zur Synthese von Peptiden und Peptid-Polymer-Konjugaten notwendig, ebenso die Beschaffung von Referenz-Peptiden. Die NMR-spektroskopischen Studien wurden überwiegend an biotechnologisch präparierten Peptiden durchgeführt, die je nach Fragestellung ^{15}N- oder ^{15}N-,^{13}C-markiert hergestellt wurden. Entsprechend entstanden signifikante Kosten für molekularbiologische Arbeiten und Reagenzien sowie für die Herstellung isotopenmarkierter Nährmedien. Die dafür angefallenen Kosten bewegten sich im erwarteten und beantragten Rahmen.

Von der PSS GmbH (inzwischen Agilent Technologies Deutschland GmbH) wurden im Rahmen eines Unterauftrags Glycidylmethacrylat (GMA) Mikropartikel erworben. Da sich die Funktionalisierung der Partikel mit Peptiden schwieriger als erwartet herausgestellt hat, wurde nur eine reduzierte Menge an Partikeln bezogen und das ursprünglich beantragte Budget nicht voll ausgeschöpft. In Absprache im dem Projektträger wurden die dadurch freigesetzten Mittel innerhalb der zuwendungsneutralen Verlängerung für Personalkosten eingesetzt.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Um die thematische Breite und die damit einhergehende notwendige Expertise abzudecken war auch ein entsprechender Personaleinsatz notwendig. Nur durch die finanzielle Unterstützung durch das BMBF wurde die experimentelle Durchführung ermöglicht, weil so die Personalkosten gegenfinanziert werden konnten. Die beantragten Mittel wurden verantwortungsvoll zur Durchführung der geplanten Forschungsarbeiten eingesetzt, so dass mit dem zur Verfügung gestellten Budget das Vorhaben auskömmlich finanziert war und durchgeführt werden konnte. Zwar verzögerte der Projektstart sich auf Grund von Auswahlverfahren bei der Rekrutierung der Projektmitarbeiter:Innen bzw. durch administrative Prozesse, mit der zuwendungsneutralen Verlängerung der Projektlaufzeit wurde aber ermöglicht, dass die ursprünglich geplante „aktive“ Laufzeit des Vorhabens von min. 36 Monaten auch zur Verfügung stand (u.a. bedeutsam für die im Projekt laufenden Promotionsvorhaben). Damit verliefen die Arbeiten insgesamt entsprechend dem geplanten Workflow.

Die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse basierten auf dem Einsatz einer Vielzahl komplexer wissenschaftlicher Geräte und Analyseverfahren. Primär zu nennen sind: automatisierte chemische Peptidsynthese, biotechnologische Präparation von Fusionsproteinen, chromatographische Trennverfahren, Laserspektroskopie, NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Hinzu kommen Techniken, die im Rahmen der Kooperation mit dem HZDR genutzt wurden: molekulare Modellierung inkl. quantenchemischer Rechnungen, isotherme Titrationscalorimetrie, ICP-MS, Phagendisplay. Die Nutzung der diversen Geräte und Techniken erforderte den Einsatz Messtechnik-spezifischer Verbrauchsmittel (Chromatographiesäulen, Küvetten, Probenröhrchen, etc.).

4. Fortschreibung des Verwertungsplans

Zunächst wird der Fokus darauf liegen, die noch nicht veröffentlichten wissenschaftlichen Ergebnisse in internationalen Fachjournalen zu publizieren (mehrere Manuskripte sind zum Zeitpunkt der Berichterstellung in Arbeit). Dies wird in Form von open-access-Veröffentlichungen geschehen, was zu einer hohen Verbreitung der Ideen und Ergebnisse des Projektes in der internationalen Wissenschaftsgemeinschaft führen wird. Außerdem werden die Projektergebnisse auf (inter)nationalen Konferenzen präsentiert.
Die etablierten synthetischen und analytischen Protokolle zur Herstellung von neuen biohybriden Polymermaterialien und deren Charakterisierung können auch auf zukünftige Materialklassen angewandt und ggfs. optimiert werden. Es wurde u.a. ein einfacher Zugang zu Disulfid-zyklisierten Peptiden entwickelt. Diese vom Lanmodulin abgeleiteten Zyklopeptide sind deutlich rigider als ihre linearen Pendants und weisen z.T. deutlich stärkere Affinitäten zu Ln(III)-Ionen auf. Polymergebunden haben diese Strukturen daher das Potential, in naher Zukunft deutlich verbesserte Extraktionsmedien hervorzubringen. Durch die Synergieeffekte zwischen Peptiden und Polymeren ist eine zusätzliche Funktionalität entstanden, die weitere Anwendungsmöglichkeiten bietet. Somit sind die Voraussetzungen geschaffen, um diese neuartige Klasse von Metallbindern in ein breites Spektrum von technischen Prozessen integrieren zu können. Der nächste Schritt wird die Fortführung der Integration der Peptid-Polymer-Konjugate in Harzträgermaterialien sein, um so Extraktionssäulen zu erhalten, die z.B. in kleinen Abwasserströmen zur Rückhaltung von Lanthanoiden eingesetzt werden können. Mit der Veröffentlichung werden die gewonnenen Ergebnisse potentiellen Anwendern zur Verfügung gestellt und können so als Ausgangspunkt für deren Forschung dienen und zur Weiterentwicklung von Produkten genutzt werden.
Mittelfristig kann der TRL-Level in Anwendungen auf TRL 5 gesteigert werden, wenn es gelingt die Selektivität innerhalb der Ln(III)-Reihe zu optimieren. Hier muss auch auf mögliche +/- Synergien durch die eingesetzten Harzträgermaterialien geachtet werden, mindestens muss aber die Fähigkeit zur Komplexierung von Metallionen nach Immobilisierung erhalten bleiben. Mit den Erfahrungen bei der Peptid- bzw. Peptid-Polymer-Auswahl kann die Erweiterung für ein Isolieren von d-Elementen (z.B. Co(II), Cu(II) oder Ni(II) angegangen werden, für die bereits prädestinierte Peptid-Erkennungssequenzen in der Literatur bekannt sind. Mit den neuen biohybriden Kompositen wird eine neue Klasse von Sorptionsmaterialien zur Verfügung gestellt, die auch in angrenzenden Bereichen, wie z.B. der Entwicklung neuer Chromatographie-Materialien zur Anwendung kommen kann.
Langfristig können entsprechende Filtermodule für die Konzeption von geschlossenen Stoffkreisläufen im Bereich von Schlüsselmaterialien (hier Ln(III) oder auch d-Metalle) einen wichtigen Baustein in der Entkopplung von Liefermonopolen werden. Durch das Baukastenprinzip gelingt ein wichtiger Schritt hin zu geschlossenen, nachhaltigen Stoffkreisläufen in verschiedenen Anwendungsfeldern, wodurch die Ressourceneffizienz verbessert wird. Im Vergleich zu etablierten Methoden zur Lanthanid-Gewinnung und Reinigung, fallen in dem neuen biohybriden Verfahren keine giftigen Chemikalienabfälle an und somit entfällt deren mitunter teure Entsorgung. Weiterhin ist zu erwarten, dass die Peptid-basierten Materialien deutlich robuster sein werden, als solche, in denen die intakten Proteine eingesetzt werden. Peptid-basierte Materialien widerstehen der Behandlung mit Säure oder Temperaturerhöhung, Veränderungen sind reversibel, so dass wesentlich höhere Lebensdauern der Komposite bzw. mehr Nutzungszyklen erreichbar sein sollten. Nicht zuletzt können Peptid-basierte Materialien in Kombination mit bioabbaubaren Polymermatrizes ein deutlich günstigeres Profil am Ende ihrer Nutzungszeit aufweisen.

5 Veröffentlichungen

Tagungsbeiträge und Veröffentlichungen:

D. Marlina, Y. Müllers, U. Glebe, M. Kumke; Spectroscopic characterization of europium binding to a calmodulin-EF4 hand peptide-polymer conjugate. RCS Advances 14 (2024) 14091 – 14099. DOI: 10.1039/d4ra01505c

L.-C. Kroh; Novel calmodulin-derived peptide-polymer composites for lanthanide recycling: Europium as luminescence probe for binding characterization. Bachelor-Arbeit, Universität-Potsdam 2024.

Y. Müllers, D. Marlina, B. Drobot, M. Kumke, U. Glebe; Peptide-Polymer Conjugates for Lanthanide Binding and Extraction. Posterpräsentation, Macromolecular Colloquium Freiburg, 27.-28.02.2025.

Y. Perevedentseva, N. Klishin, R. Nedielkov, H. M. Möller, A deep look into the interaction of modified EF-hands with various lanthanides, ICMRBS, Seoul, 18.-23.08.2024.

Y. Perevedentseva, A deep look into the interaction of modified EF-hands with various lanthanides, 23rd Symposium of the RTG “Bioactive Peptides”, Berlin, 2.-3.12.2024.

M. Ishida, Biotechnological preparation and structural characterization of peptides and cyclopeptides based on lanmodulin, Bachelor Arbeit, Universität Potsdam 2024.

Y. Perevedentseva, N. Klishin, R. Nedielkov, H. M. Möller, A deep look into structure and interaction of cyclic and linear peptides based on EF-hand motifs with various lanthanides, Euromar, Oulu, 6.-10.06.2025.

F. Kohls, Biotechnologische Herstellung und Cyclisierung von Peptiden auf Basis des EF-Hand-Motivs von Lanmodulin, Bachelorarbeit (2025).

Veröffentlichungen in Vorbereitung:

Y. Perevedentseva, L. Waurick, D. Marlina, G. Techert, Y. Müllers, F. Lederer, H. M. Möller, U. Glebe, M. U. Kumke, B. Drobot, An integrative approach towards bio-inspired sequestration of rare earth elements

D. Marlina, Y. Müllers, M. U. Kumke, U. Glebe, Peptide-Polymer Conjugates for Enhanced Lanthanide Recovery: Comparative Study Using Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy (TRLFS)

Y. Perevedentseva, N. Klishin, Y. Shan, K. Wang, R. Nedielkov, U. Glebe, H. M. Möller, NMR Spectroscopic Comparison of the Binding of Lanthanide Ions to Cyclic and Linear Peptides

Y. Shan, K. Wang, D. Marlina, M. U. Kumke, L. Qiu, U. Glebe, Effect of Multivalent Peptide-Polymer Conjugates and Particles on Lanthanide Binding and Recovery

K. Wang, Y. Shan, D. Marlina, M. U. Kumke, U. Glebe, Extraction of Lanthanide Ions with Immobilized Peptides

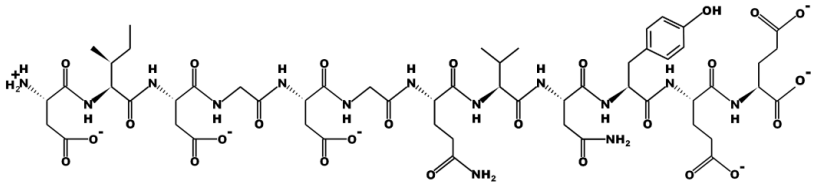
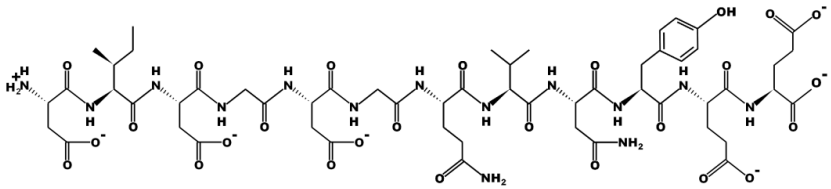
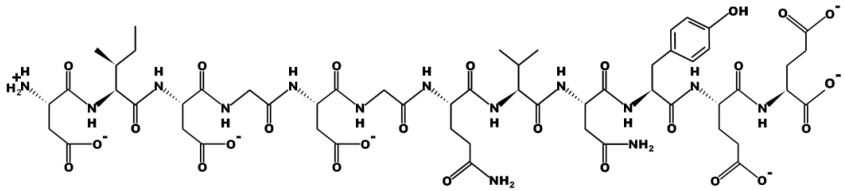
D. Marlina, EF Hand 4 Calmodulin as Biological Ligands for Sustainable Lanthanide Extraction (Arbeitstitel), Dissertation Universität Potsdam, in Bearbeitung 2025.

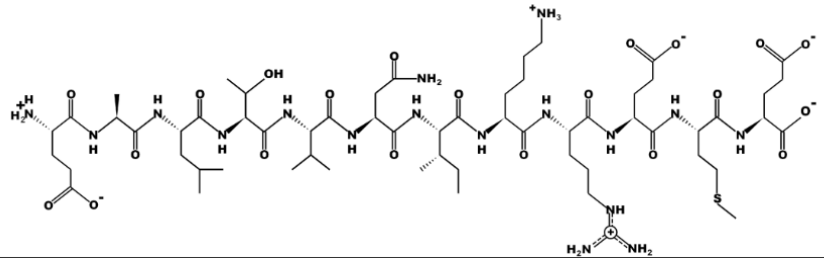
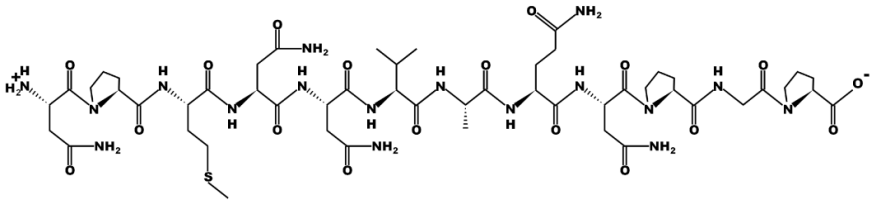
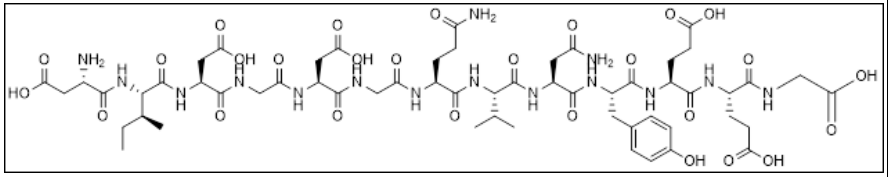
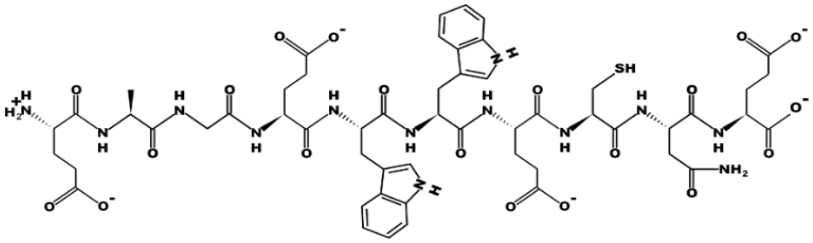
Y. Müllers, Synergistische Hybridmaterialien: Die Fusion synthetischer Polymere mit Proteinen und Peptiden für neuartige Anwendungen (Arbeitstitel), Dissertation Universität Potsdam, in Bearbeitung, 2026.

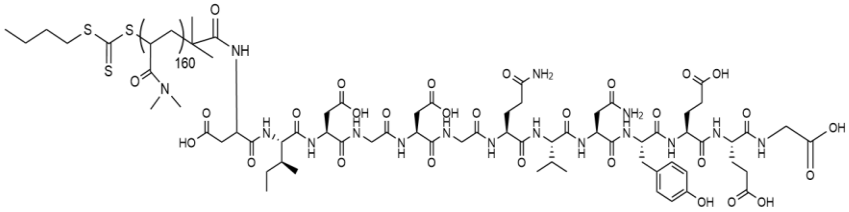
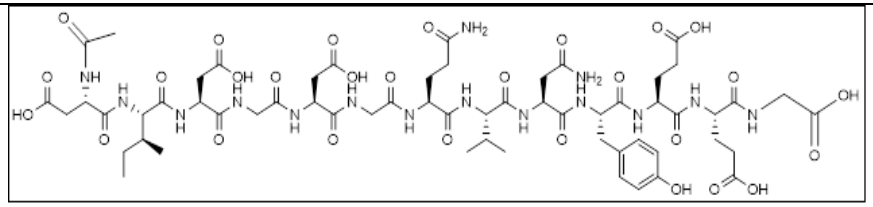
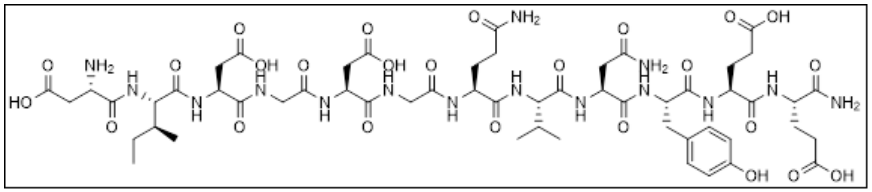
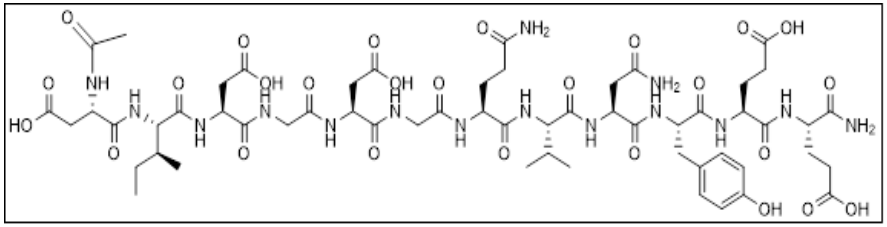
Y. Perevedentseva, Synthesis, characterization and lanthanide-binding studies of peptides derived from lanmodulin's EF-Hands (Arbeitstitel), Dissertation Universität Potsdam, in Bearbeitung, 2026.

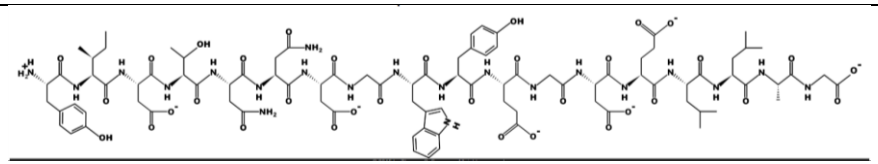
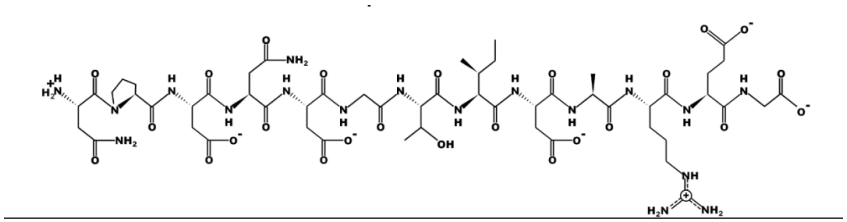
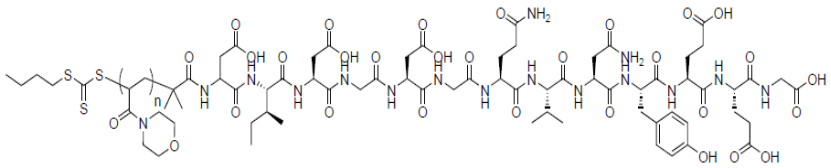
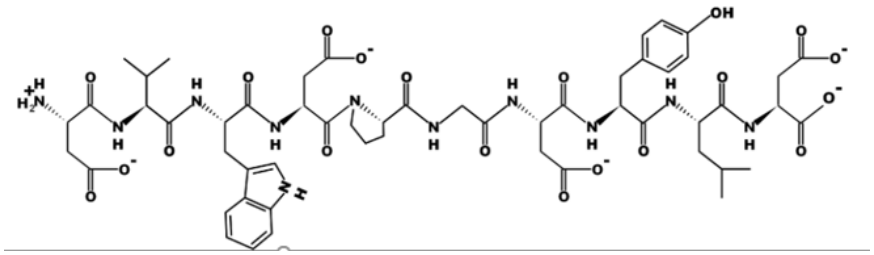
Anhang

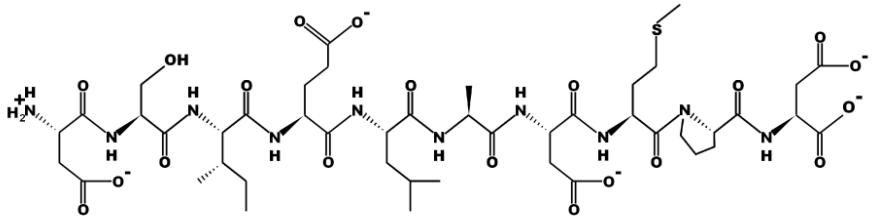
Tabelle 1A: Übersicht der mittels TRLFS untersuchten Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate

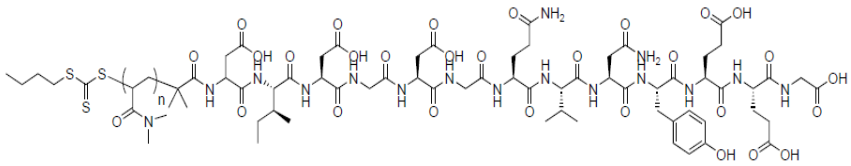
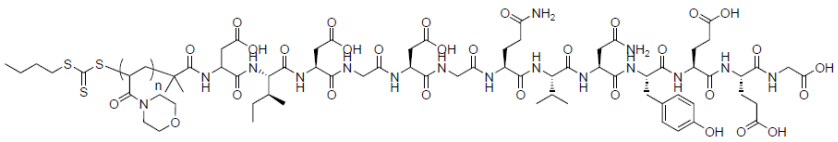
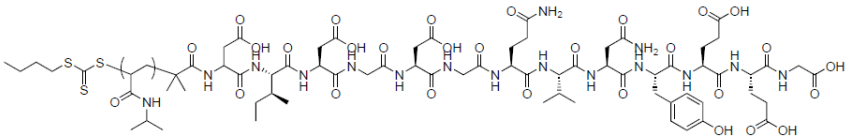
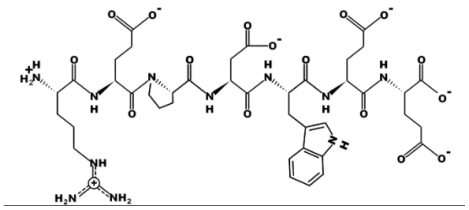
Verbindungs name	**Peptid Sequenz**	**Struktur**	**Quelle**
EF4 Hand Calmodulin	H – DIDGDGQVNYEE -OH		p&e (Anmerkung: Charge 1)
EF4 Hand Calmodulin	H – DIDGDGQVNYEE -OH		p&e (Anmerkung: Charge 2)
Recombinant EF4	H – DIDGDGQVNYEE -OH		UPAC (Bacterially expressed)

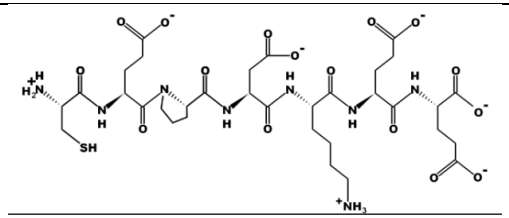
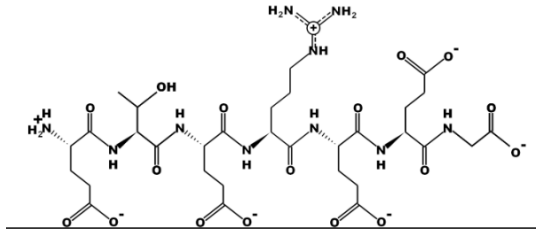
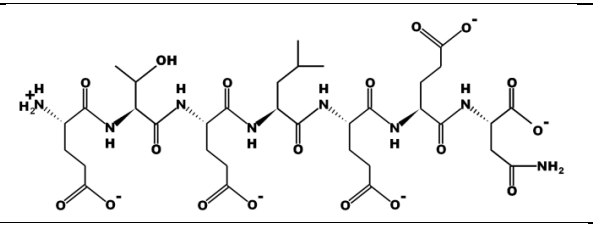
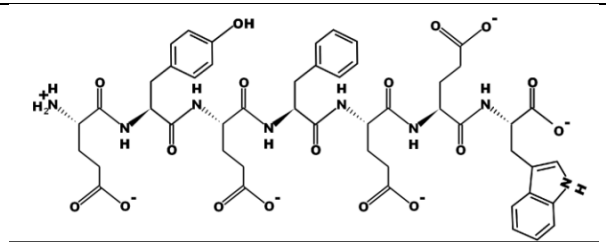
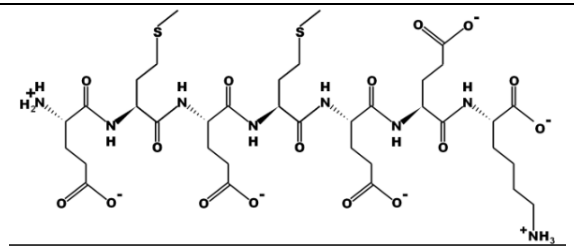
Peptid1	H – EALTVNIKREME -OH		p&e
Peptid2	H – NPMNNVAQNPGP -OH		p&e
EF4G	DIDGDGQVNYEEG		UPPPM
Peptid3	H – EAGEWWECNE -OH		p&e

YM7	pDMA160-DIDGDGQVNYEEG		UPPPM
YM3	NAc-DIDGDGQVNYEEG		UPPPM
YM5	DIDGDGQVNYEE-NH2		UPPPM
YM4	NAc-DIDGDGQVNYEE-NH2		UPPPM

LBT-G	YIDTNNDGWYEGDELLA-G		UPPPM
EF4 Lanmodulin	NPDNDGTIDAREG		UPPPM
pNAM-EF4G Calmodulin	NAM-DIDGDGQVNYEEG		UPPPM
Peptid4	H- DVWDPGDYLD -OH		p&e

Peptid5	H- DSIELADMPD -OH		p&e

pDMA-EF4G Calmodulin	DMA-DIDGDGQVNYEEG		UPPPM
pNAM-EF4G Calmodulin	NAM-DIDGDGQVNYEEG		UPPPM
pNIPAM-EF4G Calmodulin	NIPAM-DIDGDGQVNYEEG		UPPPM
Peptid 6	REPDWEE		HZDR

Peptid 7	CEPDKEE		HZDR
Peptid 8	ETEREEG		HZDR
Peptid 9	ETELEEN		HZDR
Peptid 10	EYEFEEW		HZDR
Peptid 11	EMEMEEK		HZDR

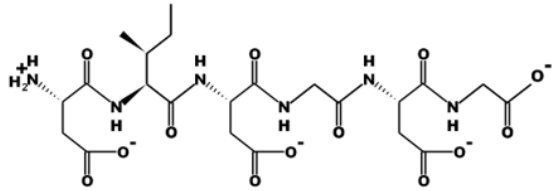
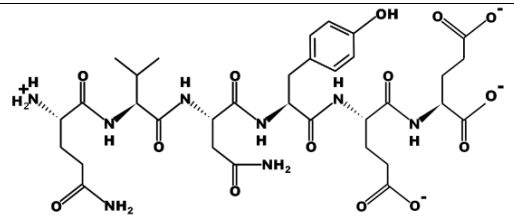
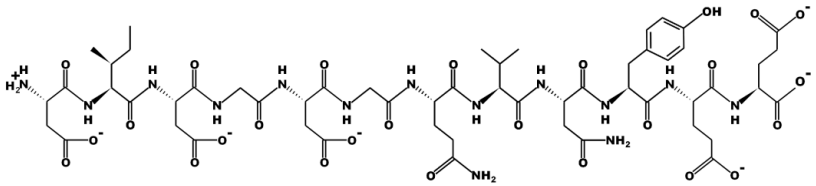
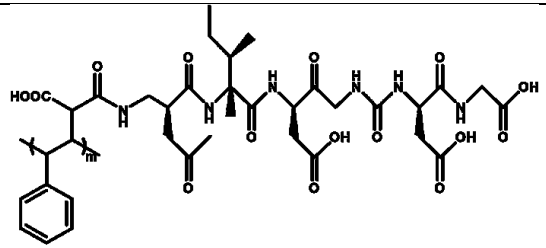
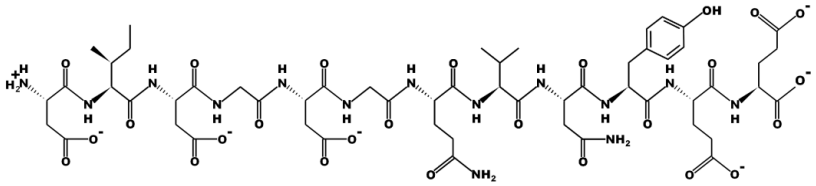
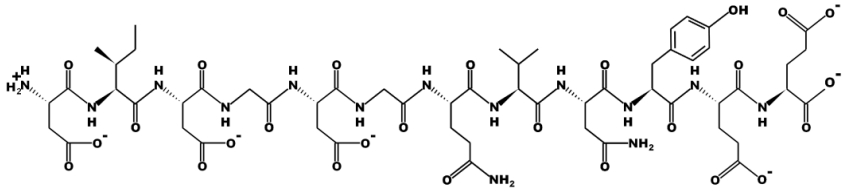
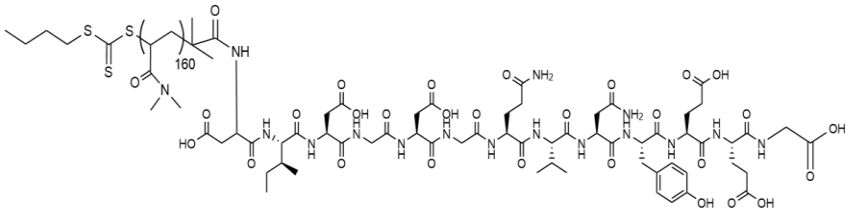
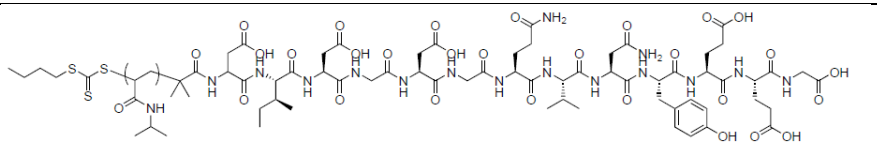
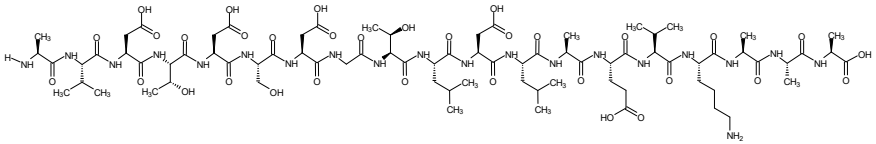
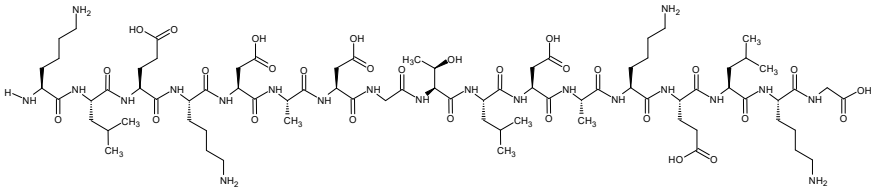
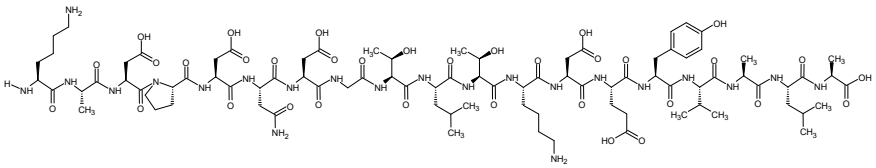
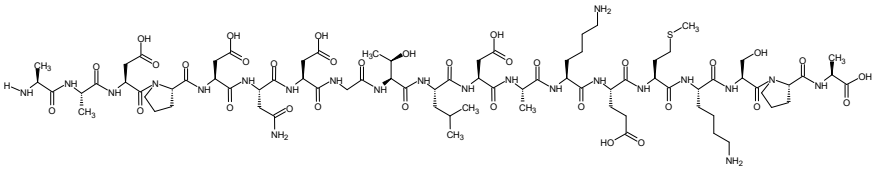
Fragment 1 EF4 Calmodulin	DIDGDG		HZDR
Fragment 2 EF4 Calmodulin	QVNYEE		HZDR
Immobilized EF4 on resin	DIDGDGQVNYEE-resin		UPPPM
G-EF4-Fragment 1	GDIDGDG	[redacted]	UPPPM
Immobilized G-EF4-Fragment 1	Resin-GDIDGDG		UPPPM

Tabelle 1B: Übersicht der mittels NMR untersuchten Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate.

Verbindungsname	**Peptid Sequenz**	**Struktur**	**Quelle**
EF4 Hand Calmodulin	H – DIDGDGQVNYEE -OH		p&e
Recombinant EF4	H – DIDGDGQVNYEE -OH		UPAC (Bacterially expressed)
YM7	CTA-DMA-DIDGDGQVNYEEG		UPPPM
pNIPAM-EF4G Calmodulin 5 KDa	NIPAM-DIDGDGQVNYEEG		UPPPM

			
Ma-22A-LEF1	AVDTDSDGTLDLAEVKAAA		UPAC (Bacterially expressed)
Ma-22A-LEF2	KLEKDADGTLDAKELKG		UPAC (Bacterially expressed)
Ma-22A-LEF3	KADPDNDGTLTKDEYVALA		UPAC (Bacterially expressed)
Ma-22A-LEF4	AADPDNDGTLDAKEMKSPA		UPAC (Bacterially expressed)