

# Eine chemoenzymatische Kupplungsstrategie zur Immobilisierung von Proteinen auf kristalliner Nanocellulose\*\*

Christina Uth, Stefan Zielonka, Sebastian Hörner, Nicolas Rasche, Andreas Plog, Hannes Orelma, Olga Avrutina, Kai Zhang\* und Harald Kolmar\*

**Abstract:** Die Immobilisierung von bioaktiven Molekülen auf Nanocellulose liefert Konjugate, die die biologischen Eigenschaften der gekuppelten Verbindungen mit Vorteilen der Cellulose wie Biokompatibilität, geringe Zytotoxizität und Nanodimension vereinen. Nachteile der klassischen Methoden zur Proteinkonjugation sind häufig ein Mangel an Selektivität, lange Reaktionszeiten, nichtphysiologische pH-Bereiche oder der Einsatz organischer Lösungsmittel sowie die Notwendigkeit, eine maßgeschneiderte Synthesestrategie für jeden Einzelfall zu entwickeln. Diese Einschränkungen umgeht das hier vorgestellte generische Zweistufenverfahren, das die Vorteile einer hoch effizienten Oximligation mit enzymatischer Proteinkonjugation auf der Oberfläche peptidmodifizierter kristalliner Nanocellulose kombiniert. Es basiert auf effizienten und orthogonalen Transformationen, erfordert keine organischen Lösungsmittel und akzeptiert physiologische Bedingungen. Durch die Orts- und Regiospezifität könnte es für die Immobilisierung einer Vielzahl funktioneller Proteine eingesetzt werden.

In den letzten Jahren ist die Entwicklung neuartiger Nanocellulose-basierter Materialien auf wachsendes wissenschaftliches Interesse gestoßen. Cellulose, ein wichtiger Baustein der Biosphäre, könnte als nachwachsender Rohstoff nicht-erneuerbare synthetische Polymere ersetzen.<sup>[1]</sup> Cellulose-basierte neue Materialien haben faszinierende Eigenschaften und wurden schon häufig im Bereich der Lebenswissenschaften und in der Technik eingesetzt.<sup>[2]</sup>

Als nachhaltige Verbindung ist kristalline Nanocellulose in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus interdisziplinärer Studien gerückt.<sup>[3]</sup> Im Allgemeinen werden Cellulosenanokristalle (CNCs) oder -nanofibrillen durch Eliminierung der amorphen Anteile aus nativen Cellulosefasern gewonnen, wobei unter anderem Säurehydrolyse, Mikrofluidisierung und TEMPO-vermittelte Oxidation (Abbildung 1 a) zum Einsatz kommen.<sup>[3b,4]</sup> Mit einem Durchmesser bis 20 nm und einer Länge zwischen 100 nm und 1  $\mu\text{m}$ <sup>[3b,4]</sup> haben CNCs eine deutlich größere Oberfläche als native Cellulose und lassen somit stärkere multiple Interaktionen zu. Darüber hinaus können sie in unterschiedlichen Lösungsmitteln, einschließlich Wasser, dispergiert und als nanoskalige Substrate zur Immobilisierung von Verbindungen eingesetzt werden, die physiologische Bedingungen zum Erhalt ihrer Biofunktionalität erfordern, darunter DNA, Proteine und Peptide.<sup>[5]</sup> In den resultierenden Konjugaten bleiben die Eigenschaften der immobilisierten Verbindungen erhalten und werden durch die Biokompatibilität und geringe Zytotoxizität der Cellulose-träger<sup>[1,2a,6]</sup> und die Vorteile, die sich aus deren Nanodimension ergeben, ergänzt.

Die Methoden zur Immobilisierung von Proteinen auf Nanocelluloseoberflächen können nach den molekularen Kräften der Bindung grob in drei Hauptgruppen eingeteilt werden: a) physikalische Interaktion zwischen Protein und Partikeloberfläche; b) Affinitätsinteraktion zwischen Protein und Ligand; c) kovalente Interaktion. Bei der kovalenten Konjugation von Proteinen müssen zwei wichtige Aspekte berücksichtigt werden: der Erhalt der strukturellen und dimensionsbedingten Eigenschaften der Nanocellulose und die Konservierung der biologischen Aktivität des ligierten Biomoleküls. Nanocellulose bedarf als bioinertes Material einer Oberflächenaktivierung oder -modifizierung, um eine Interaktion mit adressierbaren Stellen im Makromolekül zu ermöglichen.<sup>[5d-f,7]</sup> Zu diesem Zweck werden die freien, oberflächenexponierten Hydroxygruppen häufig durch TEMPO zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidiert, sodass eine direkte Amidkupplung oder weitere Modifizierungen möglich wird.<sup>[5d,e,7a,b]</sup> Bisher wurde eine Reihe von Peptiden und Proteinen auf der Oberfläche nanoskaliger Cellulose immobilisiert, unter anderem tryptophanbasierte Oligopeptide aus 2–8 Aminosäureresten,<sup>[5b,c]</sup> ein Tripeptidsubstrat für humane neutrophile Elastase,<sup>[5e]</sup> das Enzym alkalische Phosphatase und ein Anti-Hydrocortison-Antikörper.<sup>[5d]</sup>

Da der N-Terminus und alle oberflächenexponierten Ly-sinreste von Proteinen reaktive Aminogruppen enthalten, erfolgt deren Bindung an Nanopartikel unkontrolliert und kann an einer Stelle des Proteins stattfinden, die für Struktur, Stabilität oder biologische Aktivität essenziell ist (siehe Ab-

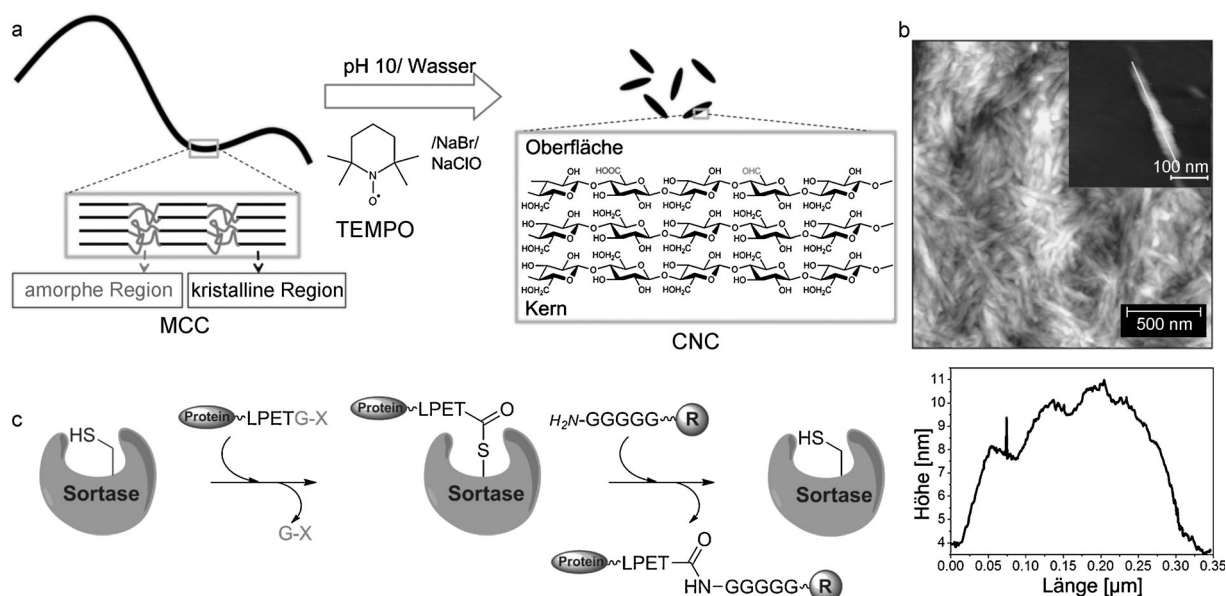
[\*] Dr. H. Orelma, Dr. K. Zhang  
Ernst-Berl-Institut für Technische und Makromolekulare Chemie  
Technische Universität Darmstadt  
Alarich-Weiss-Straße 8, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
E-Mail: zhang@cellulose.tu-darmstadt.de

A. Plog  
Center of Smart Interfaces, Technische Universität Darmstadt  
(Deutschland)

C. Uth, S. Zielonka, S. Hörner, Dr. N. Rasche, Dr. O. Avrutina,  
Prof. Dr. H. Kolmar  
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität Darmstadt  
Alarich-Weiss-Straße 4, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
E-Mail: kolmar@biochemie-tud.de

[\*\*] Die Autoren danken der Hessischen Exzellenz-Initiative LOEWE –  
Forschungscluster SOFT CONTROL und der Kooperative For-  
schungskolleg NANOKAT für die finanzielle Unterstützung sowie  
Brent Dorr (Harvard University) für das Plasmid für die Sortase-  
Expression.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404616> zu finden.



**Abbildung 1.** a) Schematische Darstellung der Synthese von CNCs aus mikrokristalliner Cellulose (MCC) durch TEMPO-vermittelte Oxidation. b) Oben: AFM-Bild der erhaltenen CNCs. Im Einschub ist das AFM-Bild eines einzelnen CNC zu sehen. Unten: zugehöriges Höhenprofil. c) Schematische Beschreibung der Sortase-katalysierten Ligation. R repräsentiert die funktionelle Gruppe der Wahl, X eine beliebige Aminosäure. Aminosäuren sind im Einbuchstabencode mit N-Terminus angegeben.

bildung S11 in den Hintergrundinformationen).<sup>[8]</sup> Deshalb wurden Alternativverfahren mit besserer Selektivität und Bioorthogonalität entwickelt, darunter das nichtkovalente Binden eines gezielt ausgewählten Antikörpers an seinen Peptidliganden, der über ein Copolymer als Spacer an die Oberfläche gebunden ist,<sup>[6b]</sup> oder das Abscheiden von Nanogold auf Polyethylenimin beschichteter Nanocellulose, was eine Funktionalisierung mit entsprechenden Thiolen ermöglicht.<sup>[7c]</sup> Die ortsspezifische Azid-Alkin-Cycloaddition wurde ebenfalls zur Immobilisierung verwendet, allerdings ist diese Synthesestrategie sehr anspruchsvoll und bei funktionellen Proteinen nicht einsetzbar.<sup>[7d]</sup> Obwohl diese Ansätze die Kupplung von humanem Immunglobulin G (IgG),<sup>[5f]</sup> Glucose-Oxidase,<sup>[9]</sup>  $\beta$ -Casein<sup>[7d]</sup> sowie Avidin-Biotin-Komplexen, Rinderserumalbumin und Anti-human-IgG<sup>[5f,10]</sup> an Cellulose-Nanogerüststrukturen ermöglichten, weisen sie einige Nachteile auf: Mangel an Selektivität, lange Reaktionszeiten, nichtphysiologische pH-Bereiche oder den Einsatz organischer Lösungsmittel sowie die Notwendigkeit, eine maßgeschneiderte Synthesestrategie für jeden Einzelfall zu entwickeln. Um diese Einschränkungen zu überwinden, wollten wir die Vorteile enzymatischer Biotransformationen für die kovalente Biokonjugation nutzen.<sup>[11]</sup>

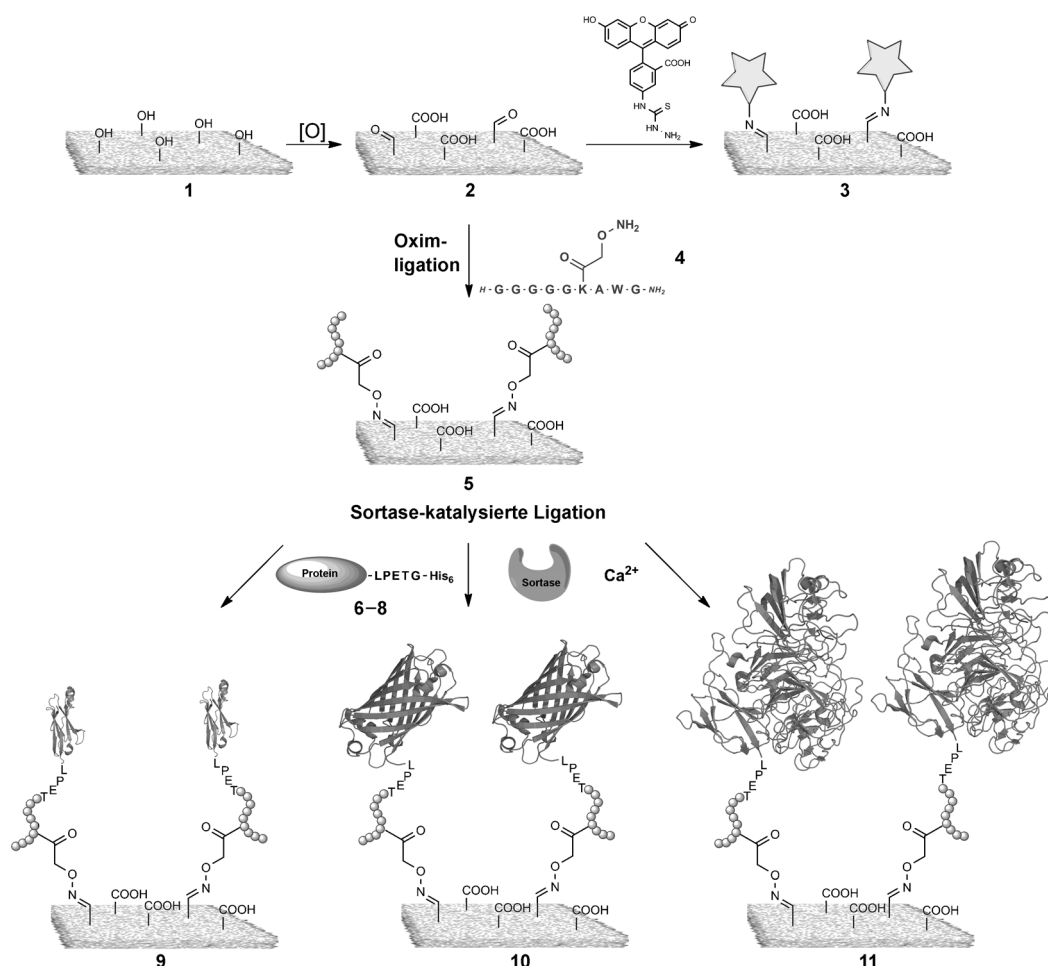
In den letzten zehn Jahren entwickelte sich die Transpeptidase Sortase A aus Gram-positiven Bakterien (in denen sie Proteine kovalent mit Peptidoglycan-Schichten verknüpft) zu einem effektiven Werkzeug für die Konjugation molekularer Konstrukte.<sup>[11b,c,12]</sup> Dieses Enzym benötigt zwei kurze peptidische Erkennungssequenzen und generiert durch Ligation eine native Amidbindung.

Das Ziel dieser Arbeit war die kovalente und regioselektive Immobilisierung von bioaktiven Proteinen auf der Oberfläche von CNCs, die mit orthogonal adressierbaren

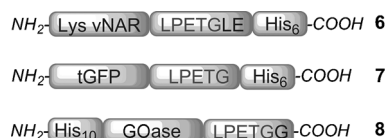
Funktionalitäten, z.B. Aldehydeinheiten, ausgestattet sind. Diese reaktiven Gruppen erlauben eine hoch effiziente und selektive Oximligation mithilfe eines aminosäurefunktionalisierten Reaktionspartners.<sup>[13]</sup> Diese Funktionalität kann leicht in Oligopeptide, sowohl an fester Phase als auch in Lösung, eingebaut werden. Allerdings ist die Oximierung bei nicht-physiologischem pH-Wert (4–5) am effektivsten. Da viele bioaktive Proteine ihre Struktur und Faltung in diesem pH-Bereich verlieren, sollten pH-Werte im physiologischen Bereich verwendet werden, was jedoch zu einer langsameren Reaktion führt. Deshalb synthetisierten wir einen Peptidlinker mit der erforderlichen Aminosäurefunktionalität (zur vorherigen Kupplung an die CNCs), der zusätzlich eine Erkennungssequenz für die enzymkatalysierte Proteinligation unter physiologischen Bedingungen enthält.

Für die Konjugation bioaktiver Proteine an die CNC-Oberfläche wurde die Sortase-A-katalysierte Immobilisierung gewählt (Abbildung 2). Diese calciumabhängige Transpeptidase erkennt zwei kurze Peptidmotive (LPXTG und Oligo-Gly) und katalysiert die Spaltung am C-Terminus von Threonin (Abbildung 1c). Die anschließende Kupplung mit dem N-Terminus des Oligo-Gly-Partners ergibt, abhängig von der Position der Erkennungseinheiten, eine neue inter- oder intramolekulare Amidbindung. Die Oligo-Gly-Sequenz wurde zuvor durch Oximligation an die CNC-Oberfläche gekuppelt und das LPETG-Motiv gentechnisch in das entsprechende Protein (Abbildung 3) eingebaut.

Die CNCs wurden aus mikrokristalliner Cellulose durch TEMPO-vermittelte Oxidation erhalten.<sup>[4a,14]</sup> Bei dieser Zweistufenreaktion werden die primären C6-Hydroxygruppen in die entsprechenden Aldehydeinheiten überführt, die Vorstufe der Carbonsäuren. Die resultierenden CNC-Oberflächen trugen sowohl Carboxy- als auch Aldehydeinheiten.



**Abbildung 2.** Allgemeine Synthesestrategie. Die CNC-Oberflächen mit ihren funktionellen Gruppen sind als graue Flächen dargestellt, Fluorescingruppen als Sterne, Peptid **4** im Einbuchstabencode und schematisch als Kette wiedergegeben; die immobilisierten Proteine wurden den Dateien 2I24, 2WQ8 und 2G6X der Proteindatenbank (PDB) entnommen.

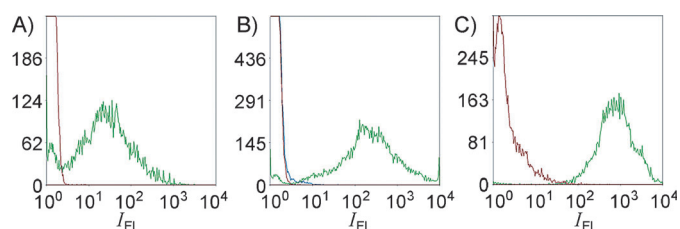


**Abbildung 3.** Design der rekombinanten Proteine. **6**: Haiantikörper-Lys-vNAR, **7**: tGFP, **8**: GOase. Alle Proteine enthalten die Sortase-A-Erkennungssequenz LPETG und ein His<sub>n</sub>-Anhängsel; *n* = 6 (**6**, **7**) oder 10 (**8**).

ten,<sup>[15]</sup> wobei der Gehalt 1.386 bzw. 0.072 mmol g<sup>-1</sup> betrug (siehe Abbildung S1 und Abschnitt 1.3 in den Hintergrundinformationen). Nach rasterkraftmikroskopischen Messungen liegen die CNCs als Stäbchen mit einem Durchmesser von ca. 7 nm und einer Länge von etwa 300 nm vor (Abbildung 1 b).<sup>[4c,16]</sup>

Die CNCs sind im Mittel kleiner als die Cellulosefibrillen, die durch TEMPO-vermittelte Oxidation aus nativen Cellulosefasern gewonnen werden.<sup>[14,17]</sup> Dies lässt sich damit erklären, dass die Vorstufe mikrokristalline Cellulose wesentlich kleiner ist als das native Pendant.

Um die oberflächenexponierten Carbonylgruppen nachzuweisen, wurde aldehydreaktives Fluorescein-5-thiosemicarbazid (5FTSC), das in einer Reihe von Anwendungen in den Lebenswissenschaften eingesetzt wird, als Fluoreszenzsonde genutzt. Die CNC-Partikel wurden dazu mit 5FTSC in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei Raumtemperatur im Dunkeln umgesetzt, gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Diagramm in Abbildung 4 A zeigt im Vergleich zu der Referenzprobe ein ausgeprägtes Fluoreszenzsignal der 5FTSC-markierten CNCs **3**. Diese Daten legen nahe, dass die modifizierten CNCs nun mit jedem geeigneten Partner mit carbonylreaktiven Gruppen, z. B. Hydrazinen,



**Abbildung 4.** Durchflusszytometrische Analyse der CNC-Konjugate.

A) Fluoreszenzmarkiertes Konjugat **3**; B) tGFP-CNC-Konjugat **10**; C) (Lys-vNAR)-CNC-Konjugat **9**. Rote Kurven: unmarkierte CNCs; blaue Kurve: CNC ohne das Sortase-Erkennungspeptid; grüne Kurven: fluoreszenzmarkierte CNCs.

Hydraziden oder Hydroxylaminen, funktionalisiert werden können. Eine direkte Kupplung von Proteinen an aldehydfunktionalisierte CNCs über Schiff-Basen-Bildung mit oberflächenexponierten Aminogruppen von Lysinresten fand dagegen nur in geringem Ausmaß statt (siehe Abbildung S12 C in den Hintergrundinformationen).

Um die Biokonjugation mit funktionellen Proteinen zu ermöglichen, wurde die Oberfläche der carbonyltragenden CNCs mit einem Oligopeptidmodul modifiziert, das die Sor-

tase-Erkennungssequenz Penta-Gly umfasst. Um die spektroskopische Analyse und Reinigung des Peptids **4** (siehe Abbildung 2) zu erleichtern, wurde ein Tryptophanrest am C-terminalen Teil des Peptids eingeführt. Die kovalente Verknüpfung des Linkers wurde mithilfe der carbonylreaktiven Aminoxygruppe realisiert, die durch die orthogonal geschützte Seitenkette von Lysin eingeführt wurde. Zu diesem Zweck wurde das Peptid auf einem Rink-Amid-Harz durch manuelle Fmoc-SPPS (Festphasen-Peptidsynthese) hergestellt (siehe Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen) und NHS-aktivierte Ethoxyethyliden(Eei)-geschützte Aminoxyessigsäure nach der acidolytischen Entschützung der Methyltritylschutzgruppe (Mtt) an die freie  $\varepsilon$ -Aminogruppe des Lysinrests gekuppelt. Nach vollständiger Synthese wurde das Peptid mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA, 92 %) und dem jeweiligen Abfangreagens unter gleichzeitigem Entfernen aller Schutzgruppen vom Harz abgespalten (siehe Abschnitt 1.8 in den Hintergrundinformationen).

Der Peptidlinker **4** wurde in Ammoniumacetatpuffer (pH 4.75) kovalent über eine Oximbindung auf der CNC-Oberfläche immobilisiert.<sup>[18]</sup> Vom Peptidmodul wurden dazu 3 Äquivalente bezogen auf die Oberflächen-carbonylgruppen eingesetzt. Laut Elementaranalyse (siehe Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen) wurden 69 % der Aldehydeinheiten mit **4** dekoriert. Nach dem Austausch des Reaktionspuffers gegen einen Puffer mit physiologischem pH-Wert (7.5) durch Dialyse oder Zentrifugieren standen die modifizierten CNCs für die enzymkatalysierte Biofunktionalisierung bereit.

Drei Proteine, die sich in Größe, Form und biologischer Aktivität unterscheiden, wurden zur Immobilisierung ausgewählt. Unser Ziel war es, CNC-Konjugate mit funktionellen, voll aktiven Proteinen zu erhalten, die kovalent und regioselektiv über ihren exponierten Carboxyterminus an die CNC-Oberfläche gekuppelt sind. Anders als eine Reihe von Verfahren, die Nanocellulose als Plattform zur nichtkovalenten oder ungerichteten Immobilisierung biologischer Liganden verwenden,<sup>[11b]</sup> ermöglicht diese neuartige Immobilisierungsstrategie eine hoch spezifische, ortsgerichtete, kovalente Kupplung.

Im ersten Experiment verwendeten wir ein 27 kDa großes Derivat des grün fluoreszierenden Proteins (tGFP), das sich dank seiner ausgeprägten Autofluoreszenz zu einem Standardreagens für Proteinkonjugationsstudien entwickelt hat.<sup>[19]</sup> Das zweite Protein in unserer Studie gehört zur Familie der kleinsten bekannten Antigen-bindenden antikörperartigen Domänen; der variable Teil des Neuen Antigenrezeptors aus Haien, wobei die Antigenbindungsstelle (Paratop) durch eine einzelne Domäne gebildet wird, die als vNAR-Domäne bezeichnet wird.<sup>[20]</sup> Das 13 kDa große Lys-vNAR-Konstrukt **6**<sup>[21]</sup> kann durch die Wechselwirkung mit seinem fluoreszenzmarkierten Bindungspartner, Hühnereiweißlysozym, nachgewiesen werden. Da wir eine modifizierte Version von Lys-vNAR mit einer zusätzlichen LPETGLE-Sequenz verwendeten, wurden die Bindungseigenschaften mit Biolayer-Interferometrie verifiziert. Dazu wurden die Kinetikparameter von **6** hinsichtlich der Bindung an Hühnereiweißlysozym bestimmt, und es wurde ein  $K_d$ -Wert von  $(4.0 \pm 0.16)$  nM ermittelt (siehe Abbildung S9 in den Hintergrundinforma-

tionen). Die Affinitäten von modifiziertem Lys-vNAR ähneln somit denen des unmodifizierten Moleküls.<sup>[22]</sup> Das dritte Modellprotein war das 70 kDa große Enzym Galactose-Oxidase (GOase), das zur Familie der Oxidoreduktasen gehört. Es verwendet zwei Substrate, D-Galactose und Sauerstoff, deren Umsetzung zu einer Hexodialdose bzw. zu Wasserstoffperoxid einfach mit einem kolorimetrischen Test nachweisbar ist.

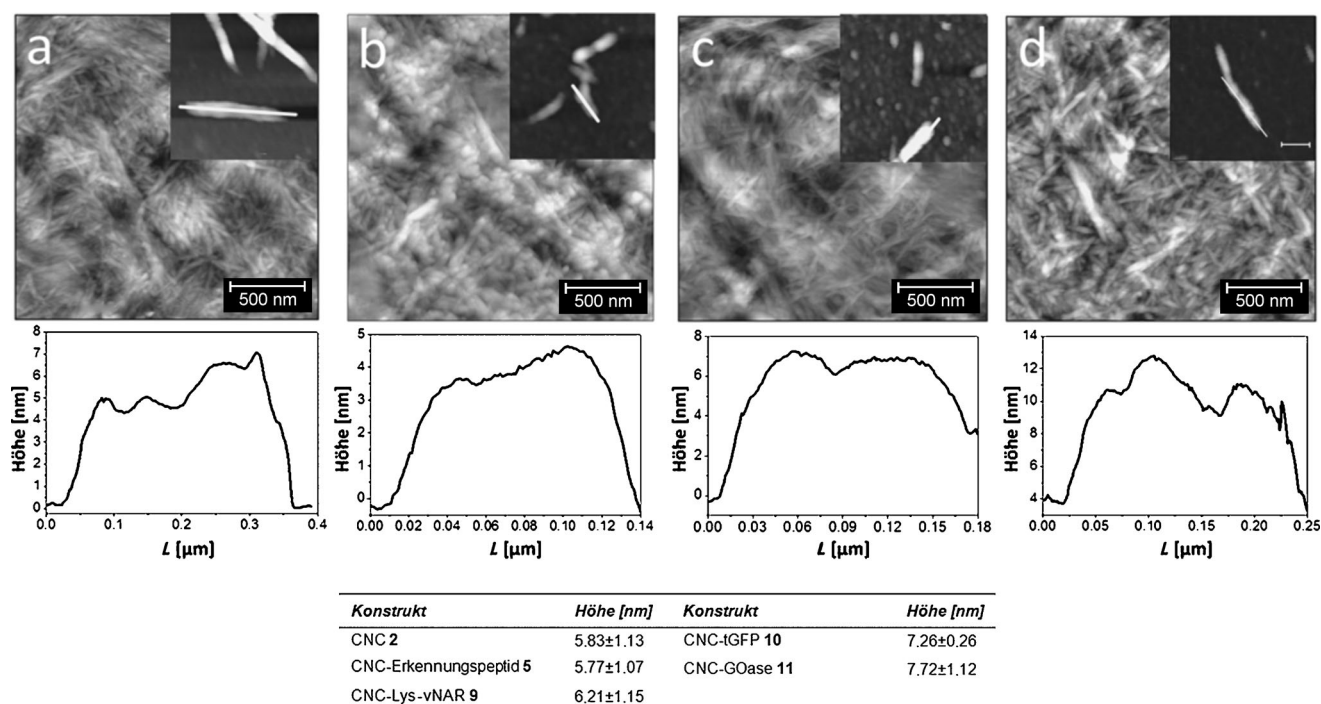
Bei allen drei Proteinen wurde die C-terminale Sortase-Erkennungssequenz LPETG gentechnisch eingebaut, und die Proteinvarianten wurden rekombinant in *E. coli* produziert. Für die Isolierung und Reinigung durch Affinitätschromatographie wurden die Proteine amino- oder carboxyterminal zusätzlich mit einem Oligohistidin-Anhängsel für die Reinigung über Ni-NTA-Harz versehen (Abbildung 3). Für die Proteinimmobilisierung wurde eine evolvierte Variante der Sortase A (bezeichnet als eSrtA) verwendet, die eine bessere Reaktionskinetik als der Wildtyp zeigt.<sup>[23]</sup>

Ein typisches Konjugationsexperiment wurde in Tris/NaCl-Puffer (pH 7.5) mit  $\text{CaCl}_2$  (5 mM) durchgeführt. Nach der Übernachtreaktion wurden die dispergierten CNC-Protein-Konjugate **9**, **10** und **11** (siehe Abbildung 2) aus den Reaktionsgemischen durch Sedimentieren isoliert und über eine Reihe von Waschschritten gereinigt (siehe Abschnitt 4 in den Hintergrundinformationen). Anschließend wurde mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) nachgewiesen, dass Länge und Form der Nanocellulosepartikel erhalten geblieben waren, in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des konjugierten Proteins aber die Partikelhöhe zugenommen hatte (Abbildung 5). Die Aktivität der immobilisierten Proteine wurde schließlich mit dem jeweiligen Assay untersucht.

Das CNC-tGFP-Konjugat wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert. In den mikroskopischen Untersuchungen konnten die tGFP-funktionalisierten Nanocellulose-Stäbchen **10** als grün fluoreszierende Punkte nachgewiesen werden (siehe Abbildung S13 in den Hintergrundinformationen). Dies zeigte, dass das Protein erfolgreich konjugiert worden war. Die Durchflusszytometrie, eine etablierte Technik, um mikroskopische Partikel anhand ihrer optischen Eigenschaften zu analysieren, wurde angewendet, um die Fluoreszenzeigenschaften individueller CNCs zu untersuchen. Das Fluoreszenzsignal der CNC-Partikel **10** war etwa 100-mal stärker als das der Referenz (nicht modifizierte CNCs), was die erfolgreiche Immobilisierung von tGFP bestätigt (Abbildung 4B). Die Einzelheiten der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung S12 in den Hintergrundinformationen zusammengefasst.

Um zu beweisen, dass das vNAR-Molekül unter Erhaltung seiner Aktivität kovalent an die CNC-Oberfläche gebunden wurde, haben wir das Konstrukt **9** nach Bindung an fluoreszenzmarkiertes Hühnereiweißlysozym über Durchflusszytometrie visualisiert (Abbildung 4C). Das Fluoreszenzprofil belegt eindeutig die Aktivität des Proteins durch Bindung an den Interaktionspartner. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Analyse von **9** komplizierter war als die von **10**, da Lysozym zu unspezifischen Wechselwirkungen mit CNCs tendiert (siehe Abbildung S12C in den Hintergrundinformationen).





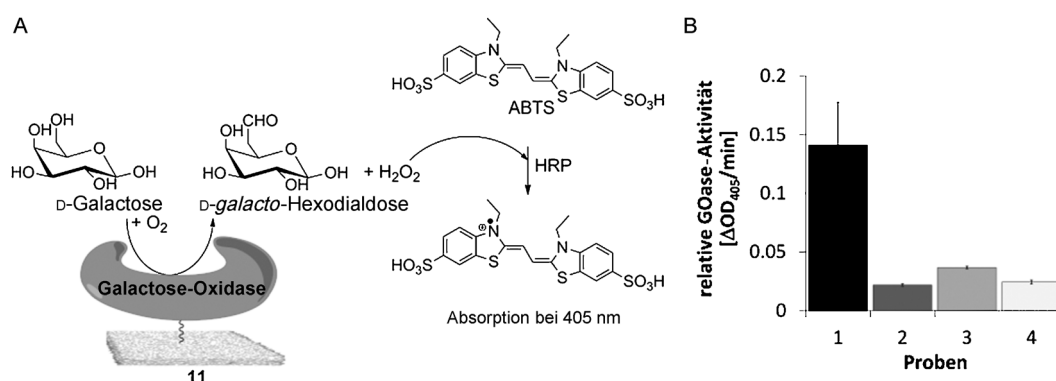
**Abbildung 5.** Oben: AFM-Bilder der funktionalisierten CNCs. a) 5 (Konjugat mit 4); b) 9 (Konjugat mit 6); c) 10 (Konjugat mit 7); d) 11 (Konjugat mit 8). Die Einschübe zeigen vergrößerte Bilder individueller CNCs. Die Höhenprofile der modifizierten CNCs sind unter jedem AFM-Bild zu sehen. Unten: Auflistung der zugehörigen Höhen.

Die Oxidation von D-Galactose zur entsprechenden D-galacto-Hexodialdose wird durch das Enzym GOase unter gleichzeitiger Bildung von Wasserstoffperoxid katalysiert. Diese katalytische GOase-Aktivität ließ sich einfach durch Kupplung der Wasserstoffperoxidbildung an eine Meerrettich-Peroxidase-katalysierte Umsetzung von ABTS nachweisen (Abbildung 6 A). Das lösliche grüne Endprodukt kann bei  $\lambda = 405$  nm photometrisch detektiert werden. Die Analyse von **11** ergab, dass die Aktivität der immobilisierten GOase erhalten geblieben war (Abbildung 6 B).

Um die Effizienz der ortsspezifischen Kupplungsstrategie mit der der üblicherweise verwendeten Konjugation über die Bildung von Amidbindungen zwischen primären Aminen der

gekuppelten Proteine und Carbonsäuregruppen des Cellulose-trägers zu vergleichen, wurde eine N-Hydroxysuccinimid-(NHS)-vermittelte Kupplung von GOase (dem größten Protein in unseren Experimenten) durchgeführt. Dazu wurden die oberflächenexponierten Carboxylatgruppen im gleichen Molverhältnis wie oximierte Carbonylgruppen mit EDC/NHS aktiviert (siehe Abschnitt 5.1 in den Hintergrundinformationen) und mit einer äquimolaren Menge GOase umgesetzt (die Mengenverhältnisse entsprechen denen, die für die Kupplung des Peptidlinkers 4 eingesetzt wurden). Die relative Enzymaktivität des immobilisierten Proteins wurde mit dem kolorimetrischen ABTS-Test überprüft, der ergab, dass das NHS-vermittelte Verfahren zu einer geringeren Aktivität

des oberflächen-immobilisierten Enzyms führte als die Sortase-katalysierte Konjugation (ca. 60% der Aktivität der Sortase-katalysierten Immobilisierung; siehe Abbildung S10 in den Hintergrundinformationen). Dieses Ergebnis ließe sich damit erklären, dass die NHS-vermittelte Immobilisierung willkürlich stattfindet und alle verfügbaren



**Abbildung 6.** Untersuchung der GOase-Aktivität nach Immobilisierung. A) Schematische Darstellung des ABTS-Tests; HRP: Meerrettich-Peroxidase. B) Photometrische Kontrolle der GOase-Aktivität von Konjugat **11** (1) im Vergleich mit folgenden Kontrollen: 2: Reaktionsgemisch ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ; 3: Reaktionsgemisch ohne Erkennungspeptid 4; 4: Reaktionsgemisch ohne Sortase. Die Fehlerbalken stammen aus einer Dreifachbestimmung.

Aminofunktionalitäten des Enzyms verwendet werden, was zu einer beschränkten Zugänglichkeit des aktiven Zentrums führen kann. Im Gegensatz dazu werden bei der Sortase-vermittelten Ligation alle Biomakromoleküle ausschließlich über ihre C-Termini gekuppelt (siehe Abbildung S11 in den Hintergrundinformationen). Jedoch hängt die Effizienz der NHS-vermittelten direkten Immobilisierung auch von der Größe und dem isoelektrischen Punkt des jeweiligen Proteins ab und könnte für andere Enzyme variieren.

CNCs sind ein interessanter und vielseitig einsetzbarer Grundkörper für die Immobilisierung von unterschiedlichen bioaktiven Substanzen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Trägern weist Nanocellulose eine große Oberfläche auf und kann leicht aus einer erneuerbaren Quelle, Cellulose, hergestellt und chemisch modifiziert werden, wobei ein Nanorelief mit oberflächenexponierten aktiven Gruppen entsteht. Diese Eigenschaften machen CNCs zu einer besonders vorteilhaften Nanoplatzform für die Immobilisierung biologischer Materialien. Die Einführung von orthogonal adressierbaren Aldehydeinheiten ermöglicht dabei die Anwendung von chemischen und/oder enzymatischen Methoden zur Kuppelung von Biomakromolekülen unter schonenden Bedingungen.

Wir haben erfolgreich primäre Alkohole auf der Oberfläche von CNCs in Aldehyde überführt, was die Kupplung bioaktiver Module mithilfe der hoch effizienten Oximligation ermöglichte. Wegen der Orthogonalität zu den reaktiven Gruppen der Peptide können Oligopeptidliganden angebunden werden, die eine weitere CNC-Modifikation ermöglichen, nämlich die Ankuppelung eines gezielt gewählten Proteins mithilfe der Transpeptidase Sortase A.

Im Vergleich zu anderen Methoden für die Proteinimmobilisierung auf von Cellulose abgeleiteten Gerüsten bietet unser Ansatz eine Reihe von Vorteilen. Erstens ermöglicht die Oberflächenoxidation von Hydroxygruppen zu den entsprechenden Aldehydeinheiten orthogonale Reaktionen, die keine Schutzgruppen bei der Oximligation erfordern. Zweitens findet die Sortase-katalysierte Proteinkonjugation unter physiologischen Bedingungen statt, was zum Erhalt der Proteinstruktur und der damit verbundenen biologischen Aktivität führt. Drittens ist die Immobilisierung ortsgerecht, kovalent, regiospezifisch und leicht steuerbar und ermöglichte infolgedessen die Herstellung maßgeschneiderter Konstrukte. Generell vereinen diese neuen G<sub>5</sub>-CNCs die intrinsischen Eigenschaften der CNC-Partikel, nämlich geringe Toxizität, Wasserkompatibilität etc., mit den Vorteilen rekombinant hergestellter Proteine. Da eine zusätzliche Schnittstelle leicht in rekombinante Proteine eingebaut werden kann, die die kontrollierte proteolytische Abspaltung von bioaktiven Proteinen von der Celluloseoberfläche ermöglicht, sind diese Konjugate auch vielversprechende Materialien z. B. für den Wirkstofftransport und die Wirkstofffreisetzung. Selbstverständlich ist unser Ansatz nicht auf Proteine beschränkt und könnte für eine Vielzahl an bioaktiven Molekülen genutzt werden.

Eingegangen am 23. April 2014  
Online veröffentlicht am 28. Juli 2014

**Stichwörter:** Bioorthogonale Proteinimmobilisierung · Cellulosenanokristalle · Enzymkatalyse · Immobilisierung · Ligationen

- [1] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3422–3458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3358–3393.
- [2] a) D. Peschel, K. Zhang, S. Fischer, T. Groth, *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 183–193; b) H. Jin, M. Kettunen, A. Laiho, H. Pynnönen, J. Paltakari, A. Marmur, O. Ikkala, R. H. A. Ras, *Langmuir* **2011**, *27*, 1930–1934; c) G. Y. Yun, J. Kim, J. H. Kim, S. Y. Kim, *Sens. Actuators A* **2010**, *164*, 68–73; d) T. Wandowski, P. Malinowski, W. M. Ostachowicz, *Smart Mater. Struct.* **2011**, *20*, 025002; e) D. Sinha, S. Pisana, A. J. Flewitt, *Smart Mater. Struct.* **2011**, *20*, 025016.
- [3] a) R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, J. Youngblood, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3941–3994; b) Y. Habibi, L. A. Lucia, O. J. Rojas, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3479–3500; c) D. Klemm, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindstrom, M. Ankerfors, D. Gray, A. Dorris, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5550–5580; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5438–5466.
- [4] a) M. Hirota, K. Furihata, T. Saito, T. Kawada, A. Isogai, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7836–7838; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7670–7672; b) S. C. Espinosa, T. Kuhnt, E. J. Foster, C. Weder, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1223–1230; c) D. Bondeson, A. Mathew, K. Oksman, *Cellulose* **2006**, *13*, 171–180; d) K. Abe, S. Iwamoto, H. Yano, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3276–3278.
- [5] a) A. P. Mangalam, J. Simonsen, A. S. Benight, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 497–504; b) S. Barazzouk, C. Daneault, *Nanomaterials* **2012**, *2*, 187–205; c) S. Barazzouk, C. Daneault, *Cellulose* **2012**, *19*, 481–493; d) S. Arola, T. Tammelin, H. Setälä, A. Tullila, M. B. Linder, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 594–603; e) J. V. Edwards, N. Prevost, K. Sethumadhavan, A. Ullah, B. Condon, *Cellulose* **2013**, *20*, 1223–1235; f) Y. X. Zhang, R. G. Carbonell, O. J. Rojas, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4161–4168.
- [6] a) M. J. Clift, E. J. Foster, D. Vanhecke, D. Studer, P. Wick, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, C. Weder, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3666–3673; b) X. Yang, E. Bakaic, T. Hoare, E. D. Cranston, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4447–4455.
- [7] a) S. Barazzouk, C. Daneault, *Cellulose* **2011**, *18*, 643–653; b) S. Barazzouk, C. Daneault, *Cellulose* **2012**, *19*, 481–493; c) V. Incani, C. Danumah, Y. Boluk, *Cellulose* **2013**, *20*, 191–200; d) M. A. Karaaslan, G. Z. Gao, J. F. Kadla, *Cellulose* **2013**, *20*, 2655–2665.
- [8] S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas, *Mikrochim. Acta* **1998**, *128*, 127–143.
- [9] V. Incani, C. Danumah, Y. Boluk, *Cellulose* **2013**, *20*, 191–200.
- [10] a) H. Orelma, L. S. Johansson, I. Filpponen, O. J. Rojas, J. Laine, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2802–2810; b) H. Orelma, I. Filpponen, L. S. Johansson, M. Osterberg, O. J. Rojas, J. Laine, *Biointerphases* **2012**, *7*, 61; c) H. Brumer, Q. Zhou, M. J. Baumann, K. Carlsson, T. T. Teeri, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5715–5721.
- [11] a) D. Rabuka, J. S. Rush, G. W. deHart, P. Wu, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1052–1067; b) M. K. M. Leung, C. E. Hagemeyer, A. P. R. Johnston, C. Gonzales, M. M. J. Kamphuis, K. Ardipradja, G. K. Such, K. Peter, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7244–7248; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7132–7136; c) T. Matsumoto, T. Tanaka, A. Kondo, *Langmuir* **2012**, *28*, 3553–3557.
- [12] a) T. Proft, *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1–10; b) M. W. L. Popp, H. L. Ploegh, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5128–5137; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5024–5032.
- [13] J. E. Hudak, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. Grob, E. Nogales, C. R. Bertozzi, D. Rabuka, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4237–4241; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4161–4165.

- [14] T. Saito, A. Isogai, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1983–1989.
- [15] a) A. Isogai, T. Saito, H. Fukuzumi, *Nanoscale* **2011**, *3*, 71–85; b) K. Zhang, S. Fischer, A. Geissler, E. Brendler, *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 894–900.
- [16] a) S. Dong, M. Roman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13810–13811; b) S. Beck-Candanedo, M. Roman, D. G. Gray, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1048–1054.
- [17] T. Saito, S. Kimura, Y. Nishiyama, A. Isogai, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2485–2491.
- [18] a) S. Fabritz, S. Hörner, O. Avrutina, H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2224–2236; b) A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7743–7746; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7581–7584; c) H. Salo, P. Virta, H. Hakala, T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, M. Manoharan, H. Lonnberg, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 815–823.
- [19] a) T. Misteli, D. L. Spector, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 961–964; b) H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, F. I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13617–13622.
- [20] V. A. Streltsov, J. N. Varghese, J. A. Carmichael, R. A. Irving, P. J. Hudson, S. D. Nuttall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12444–12449.
- [21] R. L. Stanfield, H. Dooley, M. F. Flajnik, I. A. Wilson, *Science* **2004**, *305*, 1770–1773.
- [22] H. Dooley, R. L. Stanfield, R. A. Brady, M. F. Flajnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1846–1851.
- [23] a) I. Chen, B. M. Dorr, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11399–11404; b) M. W.-L. Popp, J. M. Antos, H. L. Ploegh, *Current Protocols in Protein Science*, Supplement 56, Unit 15.3, **2009**; c) C. S. Theile, M. D. Witte, A. E. M. Blom, L. Kundrat, H. L. Ploegh, C. P. Guimaraes, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1800–1807.