

Effiziente Synthese und Anwendung von Peptiden mit adenylylierten Tyrosinresten

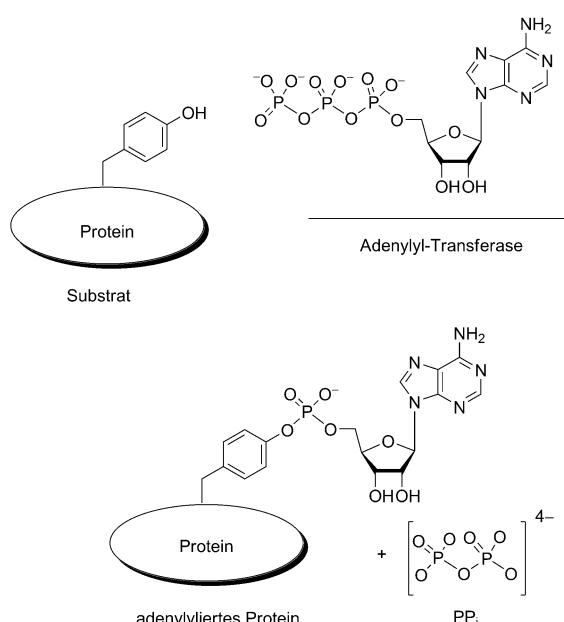
Cornelis Smit, Julia Blümer, Martijn F. Eerland, Michael F. Albers, Matthias P. Müller, Roger S. Goody, Aymelt Itzen* und Christian Hedberg*

Post-transkriptionale Modifikationen (PTMs) bieten einen vielseitigen Ansatz zur Steuerung der biologischen Aktivität von Proteinen und Enzymen. Ein faszinierendes Beispiel für die Kontrolle von Enzymaktivität ist die Regulation der bakteriellen Glutamin-Synthetase. Adenylylierung, also der kovalente Transfer eines Adenosinmonophosphats (AMP) von der Vorstufe Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxygruppe eines spezifischen Tyrosins der Glutamin-Synthetase, bewirkt bei diesem Enzym eine Verringerung der Aktivität (Schema 1).^[1a] Kürzlich wurde entdeckt, dass einige pathogene Bakterien in der Lage sind, die Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen durch Adenylylierung kleiner

GTPasen an Tyrosin- oder Threoninresten zu beeinflussen.^[1b,2,3] Kleine GTPasen wirken als molekulare Schalter und können in Gegenwart von GTP oder GDP in einen aktiven bzw. inaktiven Zustand überführt werden.^[4] Das *Vibrio-parahaemolyticus*-Effektorprotein VopS adenylyliert ein spezifisches Threonin in der Rho-Unterfamilie (Thr37 in RhoA, Thr35 in Rac1) der kleinen GTPasen.^[2] Die Substrate des Effektorproteins DrrA/SidM des humanen Pathogens *Legionella pneumophila* sind GTPasen der Rab-Unterfamilie, mit dem modifizierten Tyrosin in der Switch-2-Region (Tyr77 in Rab1b).^[3] VopS gehört zur FIC-Familie der Adenylyltransferasen, bestehend aus mehr als 2.700 Mitgliedern sequenzhomologer Proteine.^[5] Während das Substrat von VopS identifiziert wurde, sind die physiologischen Proteinsubstrate von DrrA und den verbleibenden Mitgliedern der FIC-Familie weitgehend unbekannt. Nach unserer Hypothese könnte die Identifikation der physiologischen Substrate der adenylylierenden Proteine (z. B. FIC-Domänen) durch Antikörper unterstützt werden, die spezifisch adenylylierte Proteine in eukaryotischen Zellen oder Zell-Lysaten erkennen. Die Generierung eines spezifischen Anti-Tyrosin-AMP-Antikörpers wurde bisher durch das Fehlen effizienter Synthesemethoden erschwert, was eine Synthese des reinen adenylylierten Peptidantagens im Milligramm-Maßstab verhindert hat.^[6,7,8a]

Wir beschreiben hier ein allgemeines und leicht anwendbares Verfahren für die Synthese von Peptiden mit adenylylierten Tyrosinresten unter Verwendung der 9-Fluorenmethoxycarbonyl(Fmoc)-Festphasensynthese. Dabei kommt ein Tyr-AMP-Baustein zum Einsatz, dessen Schutzgruppen unter sauren Bedingungen entfernt werden können und der so eine direkte und unkomplizierte Anwendung in der Fmoc-Festphasensynthese von Peptiden ermöglicht.

Wie auch ein aktuelles Literaturbeispiel belegt, neigen 2',3'-Bis(ester)-geschützte Adenosinreste zur Depurinierung unter sauren Bedingungen (Schema 2 A).^[8b] Wir vermuteten, dass die Depurinierungsreaktion des üblicherweise verwendeten 2',3'-Bis(ester)-geschützten Adenosins durch einen nukleophilen Effekt der 2'-Estereinheit induziert wird. Um diese saure Zersetzung zu umgehen, sollten die 2',3'-Bis(ester)-Schutzgruppen durch ein 2',3'-Isopropylidenacetal ersetzt werden, und eine desaktivierende *N*⁶,*N*⁶-Bis(Boc)-Schutzgruppe sollte zur weiteren Stabilisierung des Systems am Adenosin eingeführt werden (Schema 2B).^[9] Als Schutzgruppe für den Phosphodiester sahen wir *O*-Cyanethyl (CNE) vor, was eine unmittelbare Entschützung während der ersten Fmoc-Entfernung ermöglicht. Dadurch wird die Phosphodiesterbindung in der mono-anionischen Form stabilisiert, und man gelangt zu Aminosäure-Baustein 1 (Sche-



Schema 1. Adenylylierung von Proteinen an Tyrosinresten.

[*] C. Smit, M. F. Eerland, M. F. Albers, Dr. C. Hedberg
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

Abt. Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

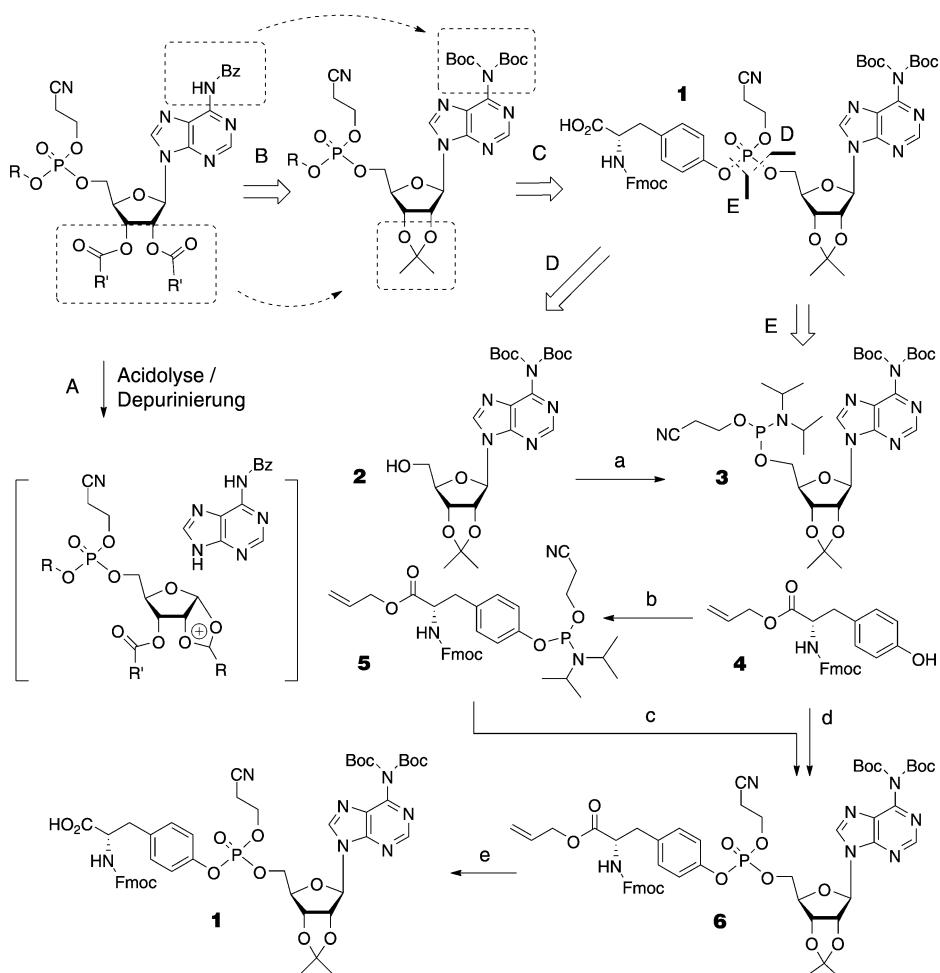
E-Mail: christian.hedberg@mpi-dortmund.mpg.de

J. Blümer, M. P. Müller, Prof. Dr. R. S. Goody, Dr. A. Itzen
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

Abt. Physikalische Biochemie

Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: aymelt.itzen@mpi-dortmund.mpg.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201103203> zu finden.



Schema 2. A) Mitwirkung des 2'-Esters führt zur Depurinierung bei der sauren Peptidabspaltung. Retrosynthese: B) Ein Wechsel der Schutzgruppenstrategie ermöglicht eine saure Abspaltung. C) Umwandlung in den finalen Baustein. D), E) Alternative Trennungsstellen für die Erstellung des CNE-geschützten Phosphodiesters führen zu zwei verschiedenen Routen. Synthese des geschützten Tyr-AMP-Bausteins. Reagenzien und Bedingungen: a) $(iPr)_2NP(Cl)O(CH_2)_2CN$ (1.2 Äquiv.), CH_2Cl_2 , DIPEA (3 Äquiv.) 30 min, $0^\circ C \rightarrow RT$, quant.; b) $iPr_2NP(Cl)O(CH_2)_2CN$ (1.2 Äquiv.), CH_2Cl_2 , DIPEA (3 Äquiv.) 30 min, $0^\circ C \rightarrow RT$, quant.; c) 1. Tetrazol (3 Äquiv.), Acetonitril, $0^\circ C \rightarrow RT$ 3 h; 2. TBHP (2.8 M in CH_2Cl_2), 1.3 Äquiv., 45%; d) 1. Tetrazol (3 Äquiv.), Acetonitril, $0^\circ C \rightarrow RT$ 3 h; 2. TBHP (2.8 M in CH_2Cl_2), 1.3 Äquiv., 56%; optimierte Vorschrift: d) 1. Tetrazol (1.2 Äquiv.) Diisopropylammoniumtetrazolid (2.2 Äquiv.), Acetonitril, $0^\circ C \rightarrow RT$ 3 h; 2. TBHP (5 M in Decan, 1.3 Äquiv.) 76%; e) $[Pd(PPh_3)_4]$ (5 mol-%), THF, $PhSiH_3$ (1.5 Äquiv.), RT 5 h, 95%. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Bz = Benzoyl, DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin.

ma 2C). Die Spaltung der Phosphodiestergruppe von **1** kann gemäß (D) oder (E) erfolgen, wodurch zwei unterschiedliche Phosphoramidit-Vorstufen (**3** und **5**) zusammen mit ihren Kupplungspartnern (**2** bzw. **4**) erhalten werden.

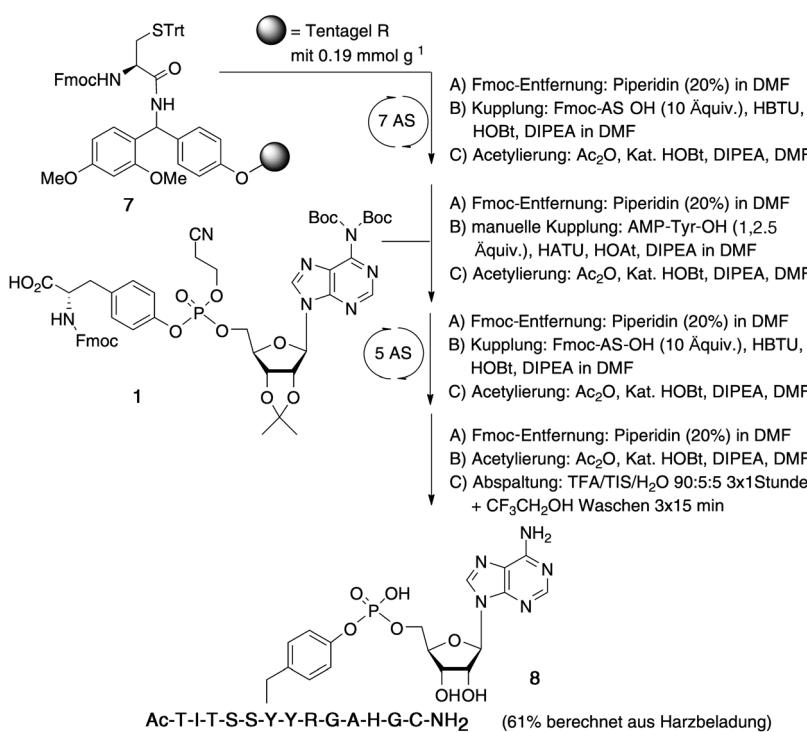
Die Synthese startete mit der Ermittlung der Kupplungseffizienz der beiden hergestellten Phosphoramidite, wobei **5** ausgehend von Fmoc-L-Tyrosinallylester **4** synthetisiert wurde,^[10] sowie der Umsetzung des *N⁶,N⁶-Bis(Boc)-2',3'-Isopropylidenadenosins* **2**^[9] in den entsprechenden Phosphoramidit-Baustein **3**.^[11] Für die Herstellung der Bausteine **3** und **5** wurde Diisopropylamino(cyanethyl)phosphorchloridat (1.2 Äquiv.) zusammen mit einem Überschuss DIPEA (3 Äquiv.) in wasserfreiem Dichlormethan verwendet (Schema 2, Stufen a und b). Die äquimolare Umsetzung des Tyrosinphos-

phoramidits **3** mit dem Adenosinderivat **2** in Acetonitril, unter Verwendung eines Überschusses wasserfreien Tetrazols (2 Äquiv.) als Promotor, gefolgt von einer Oxidation mit wasserfreiem *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) in 1,2-Dichlorethan (2.8 M, 1.3 Äquiv.) bei $0^\circ C$ bis Raumtemperatur über zwei Stunden, führte zur Bildung von Phosphodiester **6** in 45 % Ausbeute an isoliertem Produkt (Schema 2, Stufe c; 1-mmol-Maßstab) nach chromatographischer Reinigung. Als nächstes untersuchten wir die Kupplung des Fmoc-Tyrosinallylesters **4** mit dem von Adenosin abgeleiteten Phosphoramidit **3** unter analogen Bedingungen und erhielten 56 % des Phosphodiester **6** nach chromatographischer Reinigung (Schema 2, Stufe d). Die weitere Optimierung der Synthesevorschrift entsprechend Route d, unter Verwendung einer Mischung aus Tetrazol und Diisopropylammoniumtetrazolid als Aktivator, steigerte die Ausbeute auf 76 % (Protokoll 3, Hintergrundinformationen).

Desallylierung von **6** mit $PhSiH_3$ und $[Pd(PPh_3)_4]$ ^[12] ergab den gewünschten Aminosäure-Baustein **1** in 95 % Ausbeute als weißen amorphen Feststoff nach C_{18} -Sep-Pak-Kartuschen-Reinigung und Lyophilisierung.

Das Rab1-(AMP)-Antigen wurde an mit RAM-verankerten Fmoc-(Trt)-Cysteinamid funktionalisiertem Tentagel-Harz^[13] synthetisiert (**7**; Schema 3; RAM = Rink-Amid-Harz, Trt =

Triphenylmethyl). Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren (10 Äquiv.) wurde, mit Ausnahme des geschützten adenylierten Fmoc-Tyrosin-Bausteins **1**, mithilfe üblicher HBTU/HOBt-Aktivierung^[14] an einem automatisierten Peptidsynthesizer durchgeführt.^[15] Der Einbau von Baustein **1** erfolgte manuell unter Verwendung von HATU/HOAt als Aktivierungsreagens.^[16] Nach dem kompletten Aufbau der Peptidsequenz wurde N-terminal acetyliert und anschließend die globale Entschützung unter Verwendung einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA)/Triisopropylsilan (TIPS)/ H_2O (90:5:5) durchgeführt.^[17] Konzentrierung im Vakuum bei Raumtemperatur und anschließende Präzipitation mit Diethylether lieferten das Rohpeptid. Auf dieser Stufe konnten nur Spuren (<3 %) des depurierten Peptides mithilfe von



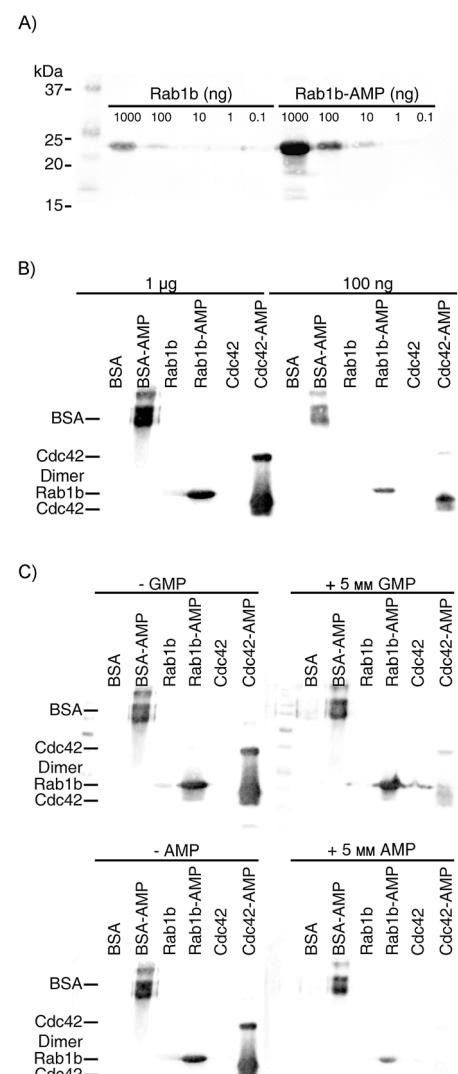
Schema 3. Festphasensynthese von Rab1-Y-77-(Adenylyl)-Peptid **8**. AS = Aminosäure, HBTU = O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOEt = 1-Hydroxybenzotriazol, HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOAt = 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol, TIS = Triisopropylsilan.

ESI-MS detektiert werden, die jedoch im ^{31}P -NMR-Spektrum nicht sichtbar waren. Nach Umkehrphasen-HPLC-Reinigung (C_{18}) und Lyophilisierung wurde **8** in 61 % Ausbeute isoliert. Zur Überprüfung der allgemeinen Anwendbarkeit dieser Methode wurden zwei weitere Peptidsequenzen mit adenylierten Tyrosinen synthetisiert (Ac-GSGA-Y*(AMP)-AGSGC-NH₂ (**S4**, 63 %) und EVYRGAE-Y*(AMP)-AVDG (**S5**, 59 %), beide in 0.1-mmol-Maßstab; siehe Hintergrundinformationen).

Das Rab1-Peptidantigen **8** wurde an das Trägerprotein Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) durch MBS-Kupplung (MBS = 3-Maleimidobenzoesäure-N-hydroxysuccinimid-Ester) konjugiert, und zwei Kaninchen wurden unter Anwendung von komplettem Freund-Adjuvans immunisiert.^[18] Fünf Verstärkungsimmunisierungen wurden über acht Wochen ausgeführt. Die finale Ausblutung, Serumisolation, Selektion über an Sepharose immobilisierten Peptidantigenen **8** und Gegenselektion über die nicht-adenylierte Rab1-Sequenz Ac-TITSSYYRGAHGC-NH₂ (**S3**, Hintergrundinformationen) lieferte ca. 6 mg an mono-selektivem polyklonalem Immunglobulin G (IgG) je Versuchstier. Für Immunadsorptionstests wurde Rab1-Peptidantigen **8** mit Rinderserumalbumin (BSA) durch MBS-Kopplung konjugiert und das entstehende BSA-**8** durch Ultrafiltration (30 kDa Ausschlussgröße; Hintergrundinformationen) gereinigt. Ein Vergleich der Antiseren von jedem Tier mithilfe eines Immunadsorptionstests mit BSA-**8** zeigte keine wesentlichen Unterschiede im Antikörpertiter (Hintergrundinformationen). In einer Western-Blot-Analyse konnte Rab1b-AMP

Abbildung 1. Affinität und Spezifität der erhaltenen α -Tyr-AMP-Antikörper. A) Western-Blot mit angegebenen Mengen an gereinigtem Rab1b und Rab1b-AMP unter Verwendung des α -Tyr-AMP-Antikörpers (Verdünnung 1:100), Demonstration der spezifischen Erkennung der Tyr-AMP-Modifikation. B) Western-Blot-Analyse von gereinigten adenylierten und unmodifizierten Formen von BSA, Rab1b und Cdc42 (1 bzw. 0.1 μg Proteinprobe pro Spur). Der α -Tyr-AMP-Antikörper (Verdünnung 1:100) bindet stark an alle getesteten adenylierten Proteine, was auf eine zusätzliche Bindungsaktivität für Thr-AMP (Cdc42) schließen lässt. C) Kompetition des α -Tyr-AMP-Antikörpers in Gegenwart von GMP oder AMP. Die Proben (je 0.1 μg) wurden wie in (B) gezeigt erstellt. Die Western-BLOTS sind mit dem α -Tyr-AMP-Antikörper in Anwesenheit und Abwesenheit von 5 mM GMP oder AMP inkubiert worden. AMP, aber nicht GMP, konkurrenierte mäßig mit der Antikörperbindung an Rab1b-AMP und BSA-AMP. Sowohl AMP als auch GMP konkurrenzierten mit dem Antikörper bei der Cdc42-AMP-Detektion. In allen Western-BLOTS wurde IRDye800-konjugiertes Esel-anti-Kaninchen-IgG als sekundärer Antikörper eingesetzt.

vom Wildtyp(wt)-Rab1b durch die erhaltenen Antikörper deutlich unterschieden werden (Abbildung 1 A). Der Grad der α -Tyr-AMP-Antikörper-Bindung an Rab1b-AMP ist ca. 20-fach höher als an unmodifizierten Rab1b. Dies deutet auf



eine wesentliche Beteiligung der AMP-Gruppe an der Antikörperbindung und eine nur schwache Erkennung des Peptidrückgrats als Teil der Immunisierung hin. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnten mit dem α -Tyr-AMP-Antikörper bis zu 10 ng Rab1b-AMP detektiert werden. Um die Spezifität des erhaltenen α -Tyr-AMP-Antikörpers zu ermitteln, wurden diese Experimente mit verschiedenen adenylierten Proteinen wiederholt. Zusätzlich zu Rab1b-AMP und BSA-8 wurde adenyliertes Cdc42 (Cdc42-AMP), das präparativ durch VopS adenyliert wurde, verwendet. Es wurde berichtet, dass VopS Cdc42 spezifisch Thr35 adenyliert,^[2] was eine Verwendung als Kontrolle ermöglicht. So konnte gezeigt werden, dass der α -Tyr-AMP-Antikörper zwischen adenylierten Threoninen und Tyrosinen unterscheiden kann (Abbildung 1B). Offenbar bindet der α -Tyr-AMP-Antikörper spezifisch adenyliertes BSA-8 und Rab1b-AMP gegenüber den nicht modifizierten Proteinen. Allerdings erkennt der Antikörper auch Cdc42-AMP, was darauf hinweist, dass ebenfalls adenylierte Threonine detektiert werden können. Dies lässt nochmals auf einen wesentlichen Beitrag der AMP-Gruppe zur Antikörperbindung mit einem nur geringen Einfluss der modifizierten Aminosäureseitenkette und des Peptidrückgrats schließen.

Um die Bindungsspezifität des erhaltenen α -Tyr-AMP-Antikörpers weiter bewerten zu können, haben wir Nukleotid-Kompositionsexperimente durchgeführt. Die Bindung von α -Tyr-AMP an 8-BSA (wt-BSA als Kontrolle), AMP-Rab1b (wt-Rab1b als Kontrolle) und AMP-Cdc42 (wt-Cdc42 als Kontrolle), wurde in der Anwesenheit und Abwesenheit von entweder GMP oder AMP durchgeführt (Abbildung 1C). In der Gegenwart von GMP konnte keine Minderung der Bindung des α -Tyr-AMP-Antikörpers an BSA-8 oder Rab1b-AMP detektiert werden. Bei einer Inkubation mit AMP nahm das Signal für die Bindung des α -Tyr-AMP-Antikörpers jedoch signifikant ab, was die Relevanz der Adeninbase der AMP-Gruppe für die Wechselwirkung mit dem Antikörper belegt. Interessanterweise konkurrieren sowohl GMP als auch AMP mit der Bindung vom α -Tyr-AMP-Antikörper an Cdc42-AMP, wobei die Verdrängung mit AMP etwas effektiver zu sein scheint als mit GMP. Diese Beobachtung könnte auf eine starke Erkennung des Furansidrestes und der Phosphatgruppe des GMP/AMP hinweisen, was zu einem hohen Grad an Konkurrenz zwischen AMP und GMP in Abwesenheit der Rab1b-Peptidsequenz führen würde.

Um die Anwendbarkeit der Rab1-Antikörper weiter zu untersuchen, führten wir Bindungsexperimente mit adenylierten Proteinen in Zell-Lysaten durch. Für diesen Zweck wurden exogen adenyliertes Rab1 und Cdc42 zu Säugetier-Cos7 (Meerkatzen-)Zell-Lysat hinzugefügt. Wir waren in der Lage, vorzugsweise adenyliertes Rab1 zu binden, was eine Spezifität des α -Tyr-AMP-Antikörpers sogar in der Gegenwart der kompetitiven Umgebung des Zell-Lysates zeigt (Abbildung 2).

Die generierten Tyrosin-AMP-spezifischen Antikörper können zur Identifizierung der physiologischen Substrate FIC-Domänen-haltiger Proteine (z.B. BepA^[19] sowie DrrA^[3]) beitragen. Des Weiteren bieten diese Peptid-basierten Werkzeuge die Möglichkeit zu untersuchen, ob die Ade-

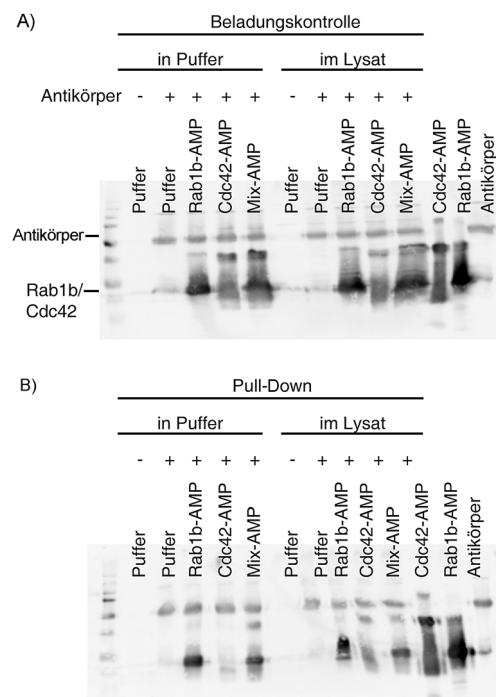


Abbildung 2. Bindungsexperimente von adenyliertem Rab1/Cdc42 aus Säugetierzell-Lysaten. Präparativ adenyliertes Rab1 und Cdc42 (je 0.1 µg) wurden zum Puffer oder 100 µg Cos7-Zell-Lysat hinzugefügt. Ein biotinylierter α -Tyr-Rab1-AMP-Antikörper wurde an magnetischen Streptavidin-Kügelchen immobilisiert und für Pull-Down-Experimente für die Rab1-AMP- und Cdc42-AMP-Proben genutzt. A) Kontrolle der Proben vor dem Pull-Down. B) Pull-Down-Experiment von (A). In allen Western-Blots wurde IRDye800-konjugiertes Esel-anti-Kaninchens-IgG als sekundärer Antikörper verwendet.

nylierung von Proteinen auch in der Abwesenheit pathogener adenylierter Proteine ein häufigerer, gegenwärtig vielleicht unterschätzter Prozess in eukaryotischen Zellen ist.

Eingegangen am 10. Mai 2011,
veränderte Fassung am 20. Juni 2011
Online veröffentlicht am 25. August 2011

Stichwörter: Adenylierung · Antikörper · Peptide · Posttranskriptionale Modifikationen · Rab-Proteine

- [1] a) E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44357–44364;
b) aktueller Übersichtsartikel über Adenylierung: A. Itzen, W. Blankenfeldt, R. S. Goody, *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 221–228.
- [2] M. L. Yarbrough, Y. Li, L. N. Kinch, N. V. Grishin, H. L. Ball, K. Orth, *Science* **2009**, *323*, 269–272.
- [3] M. P. Müller, H. Peters, J. Blümer, W. Blankenfeldt, R. S. Goody, A. Itzen, *Science* **2010**, *329*, 946–949.
- [4] Aktueller Übersichtsartikel zum Thema der kleinen GTPasen als Regulatoren des vesikulären Transports: A. Itzen, R. S. Goody, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*, 48–56.
- [5] L. N. Kinch, M. L. Yarbrough, K. Orth, N. V. Grishin, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5818.
- [6] Y. H. Hao, T. Chuang, H. L. Ball, P. Luong, Y. Li, R. D. Flores-Saaib, K. Orth, *J. Biotechnol.* **2011**, *151*, 251–254.

- [7] R. A. Al-Eryania, L. Yan, H. L. Ball, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1730–1731.
- [8] a) Frühes Beispiel für die Synthese von Zwischenstufen von adenylierten Tyrosin: J. A. Todhunter, D. L. Purich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *59*, 82–85; b) G. J. van der Heiden van Noort, H. S. Overkleef, G. A. van der Marel, D. V. Filippov, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5733–5736.
- [9] H. Ikeuchi, M. E. Meyer, Y. Ding, J. Hiratake, N. G. J. Richards, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*(18), 6641–6650.
- [10] S. Ficht, R. J. Payne, R. T. Guy, C.-H. Wong, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3620–3629. Früheres Beispiel eines CNE-Phosphoramidit-Bausteins von Fmoc-Tyrosinmethylester: C. D. Claeboe, R. Gao, S. M. Hecht, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5685–5691.
- [11] Aktueller Übersichtsartikel über Phosphoramidit-Chemie: C. Hoebartner, F. Wachowiak, *Chem. Biol. Nucl. Acids* **2010**, *1*–37.
- [12] M. Dessolin, M. G. Guillerrez, N. Thieriet, F. Guibe, A. Loffet, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5741.
- [13] Bezogen von Rapp Polymere GmbH.
-
- [14] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Ziodrou, *Synthesis* **1984**, 572.
- [15] Peptid-Festphasensynthese wurde an einem Applied-Biosystems-Peptid-Synthesizer durchgeführt, eingerichtet für das Fmoc-Verfahren.
- [16] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [17] Zwischen jeden Spaltungszyklus wurde das Harz mit Trifluorethanol gewaschen ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 3×2 mL), um partiell entschütztes Peptid vom Harz zu lösen. Nach Filtrierung des Harzes wurden zusätzliche 10% H_2O zur kombinierten Spaltungsmixtur gegeben, die 60 min aufbewahrt wurde, um eine komplette Entfernung des Isopropylidenacetals vor der Konzentrierung und Präzipitation mit Diethylether zu gewährleisten.
- [18] Peptid-Konjugation, Immunisierung und Antikörperreinigung wurden von Biogenes GmbH (www.biogenes.de) durchgeführt.
- [19] D. V. Palanivelu, A. Goepfert, M. Meury, P. Guye, C. Dehio, T. Schirmer, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 492–499..