

Lars Franke

# Von der Protease zur Peptidsynthase

Der Einfluss des Oxyanion-Lochs auf  
die reverse Proteolyse am Beispiel  
von Trypsin



Springer Spektrum

---

# Von der Protease zur Peptidsynthese

---

Lars Franke

# Von der Protease zur Peptidsynthase

Der Einfluss des Oxyanion-Lochs auf  
die reverse Proteolyse am Beispiel  
von Trypsin

 Springer Spektrum

Lars Franke  
AG Naturstoffbiochemie  
MLU Halle-Wittenberg  
Halle, Deutschland

Zugl.: Dissertation, MLU Halle-Wittenberg, 2019

ISBN 978-3-658-30436-2      ISBN 978-3-658-30437-9 (eBook)  
<https://doi.org/10.1007/978-3-658-30437-9>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, ein Teil von Springer Nature 2020

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag, noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

*"Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen, sondern mit den Augen die Tür zu finden."*  
(Werner von Siemens (1816 - 1892))

# Vorwort und Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen einer ordentlichen Promotion in der Abteilung Naturstoffbiochemie von Prof. Dr. Frank Bordusa an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und war ein Teilprojekt innerhalb des Landesexzellenznetzwerkes „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“.

Die Idee, Proteasen für die enzymkatalysierte Peptidsynthese einzusetzen, wurde bereits 1898 von VAN'T HOFF aufgrund der mikroskopischen Reversibilität der Reaktion postuliert. Diese These konnte 1937 von BERGMAN experimentell bestätigt werden. Wenn gleich die enzymatische Peptidsynthese durch Proteasen möglich ist und Proteasen eine hervorragende Interaktion mit dem Peptidrückgrat aufweisen, so stellen diese Enzyme keine idealen Katalysatoren für diese Reaktion, aufgrund ihrer natürlichen Funktion, dar.

Auf der Suche nach alternativen Enzymen für die enzymatische Peptidsynthese konnte die Thioesterase als potentieller Kandidat identifiziert werden. Diese Enzym eignet sich hervorragend für die Peptidbindungsknüpfung und ist sowohl strukturell als auch mechanistisch mit den Serinproteasen verwandt. Dennoch ist auch diese Enzym nur bedingt für die Synthese einsetzbar da die Substraterkennung strukturell begrenzt ist.

Eine Kombination der Vorteile aus Protease und Thioesterase schien sinnvoll und wurde in dieser Arbeit betrachtet, um für die enzymatische Peptidsynthese neuartige und wirkungsvolle Katalysatoren zur Verfügung zu stellen.

Das Zustandekommen dieser Arbeit habe ich einer Vielzahl von Leuten zu verdanke, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Besonderer Dank gilt dabei den folgenden Personen:

- Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Frank Bordusa für die Unterstützung, das kritische Hinterfragen und die gewährten Freiheiten.
- Prof. Gunter Fischer danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und das resolute Nachfragen zum Abschluss meiner Arbeit.
- Dr. Markus Liebscher habe ich für die Unterstützung bei den CD-Spektren, der Klonierung, den PPIase-Messungen und der äußerst kritischen Hinterfragung aller Ergebnisse zu danken.
- Ebenso hab ich Dr. Sandra Liebscher für die Überlassung von Vektoren, das Korrekturlesen meiner Arbeit und entscheidenden kritischen Anmerkungen zu *N*-Terminale Modifizierung von Parvulin 10 zu danken.
- André Diessner habe ich für eine ganze Reihe von Dingen zu danken. Da wäre zum einen die Kooperation bei den Peptidsynthesen, die Unterstützung im Labor, die Hilfe bei der Reinigung des Parvulin 10 und dem Korrekturlesen meiner Arbeit, sowie den reichlich vorhandenen Kaffeepausen.

- Für die Überlassung von Substanzen, sowie Anmerkungen zu Synthesen danke ich Dr. Andreas Pech, Dr. Nicole Wehofsky, Christoph Meyer, Dr. Ilona Born und Dr. Bianca Hardtrodt.
- Andreas Simon danke ich für die Überlassung von Vektoren und Trypsin E80C.
- Für den Vergleich der PDB-Daten der Übergangszustände von Substraten, Substratanalogen und Inhibitoren im aktivem Zentrum von Trypsin danke ich PD Dr. Iris Thondorf.
- PD Dr. Golbik danke ich für die kritischen Anmerkungen zu meinen Arbeiten.
- AG-Wahle gilt mein Dank für den zur Nutzung überlassenen Fluoreszenzscanner, hier im besonderen Mario Fiedler und Dr. Uwe Kühn.
- AG-Schwarz danke ich für das zur Nutzung überlassenen CD-Spektrometers.
- Dem Landesexzellenznetzwerk „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“ danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.
- Zu guter Letzt möchte ich mich noch für die Geduld und Unterstützung bei meinen Freunden, meinen Eltern sowie bei meiner Familie bedanken.

Lars Franke

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> . . . . .	<b>XIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> . . . . .	<b>XV</b>
<b>Reaktionsschemata</b> . . . . .	<b>XVII</b>
<b>Nomenklatur</b> . . . . .	<b>XIX</b>
<b>Teil I</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b> . . . . .	<b>3</b>
1.1 Die natürliche Proteinbiosynthese . . . . .	3
1.2 Anthropogene Proteinsynthese . . . . .	4
1.2.1 Peptidsynthese und deren chemische Ligation . . . . .	4
1.2.2 Enzymatische Ligationsverfahren . . . . .	6
1.3 Vorstellung des Konzepts . . . . .	14
<b>2 Zielstellung</b> . . . . .	<b>19</b>
<b>Teil II</b> . . . . .	<b>21</b>
<b>3 Theoretischer Teil</b> . . . . .	<b>23</b>
3.1 Überexpression und Reinigung der Varianten . . . . .	23
3.1.1 Generierung der Trypsinvarianten auf DNA-Ebene . . . . .	23
3.1.2 Überexpression und Reinigung . . . . .	23
3.1.3 Analytik . . . . .	26
3.2 Untersuchung zur Struktur der Trypsinvarianten . . . . .	28
3.2.1 Disulfidverbrückung . . . . .	30
3.2.2 Sekundärstruktur . . . . .	31
3.3 Enzymatische Charakterisierung . . . . .	32
3.3.1 Hydrolysestudien . . . . .	33
3.3.2 Bestimmung kinetischer Konstanten . . . . .	34
3.3.3 Berechnung der Änderungen der Energie der Übergangszustände . . . . .	35
3.3.4 Bestimmung des Effizienzparameters . . . . .	37
3.3.5 Kinetische Parameter der Acyltransferreaktion . . . . .	40
3.3.6 Proteinmodifizierung . . . . .	41
<b>Teil III</b> . . . . .	<b>43</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> . . . . .	<b>45</b>
4.1 Generierung und Reinigung der Trypsinvarianten . . . . .	45
4.1.1 Generierung der Trypsinvarianten auf DNA-Ebene . . . . .	45
4.1.2 Expression und Reinigung . . . . .	45
4.2 Untersuchung der Struktur . . . . .	52
4.2.1 Disulfidverbrückung . . . . .	52

4.2.2	Sekundärstruktur . . . . .	54
4.3	Enzymatische Charakterisierung . . . . .	59
4.3.1	Hydrolysestudien . . . . .	59
4.3.2	Initiale Hydrolysegeschwindigkeit . . . . .	61
4.3.3	Bestimmung kinetischer Konstanten für ausgewählte Substrate . . . . .	67
4.3.4	Energieberechnung der Übergangszustände . . . . .	69
4.3.5	Bestimmung des Effizienzparameters . . . . .	80
4.3.6	Kinetische Parameter der Acyltransferreaktion . . . . .	83
4.3.7	Proteinmodifizierung . . . . .	90
4.3.8	Vor- und Nachteile gegenüber anderen Modifizierungsreaktionen . . . . .	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung . . . . .</b>	<b>95</b>
	<b>Literaturverzeichnis . . . . .</b>	<b>99</b>
	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>119</b>
<b>A</b>	<b>Material . . . . .</b>	<b>123</b>
A.1	Chemikalien . . . . .	123
A.2	Enzyme . . . . .	123
A.3	Molekularbiologische Kits . . . . .	124
A.4	Längenstandard/Molekülmassenstandard . . . . .	124
A.5	Stämme . . . . .	124
A.6	Nukleotide und Oligonukleotide . . . . .	125
A.7	Vektoren . . . . .	125
A.8	Kulturmedien . . . . .	126
A.9	Antibiotika . . . . .	126
A.10	Geräte und Zubehör . . . . .	127
A.11	Datenverarbeitung . . . . .	128
<b>B</b>	<b>Methoden . . . . .</b>	<b>129</b>
B.1	Chemische Synthesen . . . . .	129
B.1.1	Darstellung von Aminosäureestern der allgemeinen Struktur Bz-Xaa-OMe . . . . .	129
B.1.2	Darstellung der Verbindungen Z-K-S-Me, Z-K-O-Me und Z-K-NH-Me . . . . .	129
B.1.3	Darstellung des Aminosäureesters der Struktur Bz-G-OGp . . . . .	130
B.1.4	Darstellung der Peptide der allgemeinen Struktur vom Typ MAA-Xaa-AG und MAAAG . . . . .	130
B.1.5	Darstellung der Peptidester FAM-AAK-S-Me und Abz-AAK-OMe . . . . .	131
B.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	131
B.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	131
B.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	131
B.3.2	Coomassie-Färbung . . . . .	132
B.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	132
B.3.4	Expression und Reinigung der Trypsinvarianten . . . . .	132
B.3.5	Bestimmung der Aktivität von Trypsin . . . . .	132
B.3.6	Chromatographische und massenspektrometrische Analysen . . . . .	133
B.3.7	Titration mit ELLMAN'S-Reagenz . . . . .	133

---

B.3.8	CD-Spektren . . . . .	133
B.3.9	Bestimmung kinetischer Parameter . . . . .	134
B.3.10	Modifizierung von Parvulin 10 . . . . .	136
<b>C</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>137</b>
C.1	Liste Ester und Peptide . . . . .	137
C.2	Sequenzen . . . . .	139
C.2.1	Nukleotidsequenzen der Trypsinvarianten . . . . .	139
C.2.2	Aminosäuresequenzen der Trypsinvarianten . . . . .	142
C.2.3	Aminosäuresequenzen von Parvulin10 und Varianten . . . . .	143
C.2.4	Vektoren . . . . .	143
C.3	Massenspektren und Chromatogramme . . . . .	144
C.3.1	Massenspektren der generierten Trypsinvarianten . . . . .	144
C.3.2	Massenspektren vom Parvulin 10 und dessen Varianten . . . . .	145
C.3.3	Chromatogramme der generierten Trypsinvarianten . . . . .	146
C.4	Sekundärstruktur der Trypsinvarianten . . . . .	147
C.5	Effizienzparameter der Trypsinvarianten . . . . .	148
C.5.1	Effizienzparameter beim Acyltransfer auf Aminosäureamide . . . . .	148
C.5.2	Effizienzparameter beim Acyltransfer auf Pentapeptide . . . . .	150
C.6	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Bestimmung der modifizierten Parvulin 10-Varianten . . . . .	151
C.7	Schemata der Übergangszustände von Trypsin katalysierten Reaktionen . . . . .	152
<b>Index</b>	. . . . .	<b>155</b>
<b>Publikation</b>	. . . . .	<b>159</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Einleitung - Schema der Festphasenpeptidsynthese . . . . .	5
1.2	Einleitung - Schema des Substratmimetikakonzeptes . . . . .	9
1.3	Einleitung - Schema der Funktion der GramcidinS-Synthetase . . . . .	12
1.4	Einleitung - Relative Energien der Übergangszustände . . . . .	15
1.5	Einleitung - Vergleich: Aktives Zentrum Thioesterase - Trypsin . . . . .	16
1.6	Einleitung - Oxyanion-Loch . . . . .	17
3.1	Theoretischer Teil - Übersicht der durchzuführenden Arbeiten . . . . .	25
3.2	Theoretischer Teil - Strukturbereich des Trypsins mit möglichen Veränderungen in den Trypsinvarianten . . . . .	30
4.1	Ergebnisse und Diskussion - SDS-PAGE der Reinigungsschritte . . . . .	46
4.2	Ergebnisse und Diskussion- Erhebung der Daten zur Bestimmung der aktiven Trypsinmenge . . . . .	50
4.3	Ergebnisse und Diskussion - SDS-PAGE der Trypsinvarianten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen . . . . .	53
4.4	Ergebnisse und Diskussion - Anionisches Rattentrypsin II mit Disulfidbrücken	54
4.5	Ergebnisse und Diskussion - CD-Spektren . . . . .	55
4.6	Ergebnisse und Diskussion - Reaktivität von Carbonsäurederivaten . . . . .	64
4.7	Ergebnisse und Diskussion - Abgangsgruppen von Substratmimetika . . . . .	66
4.8	Ergebnisse und Diskussion - Vereinfachtes Modell der Kinetik und Thermodynamik der Hydrolysereaktion durch Trypsin . . . . .	74
4.9	Ergebnisse und Diskussion - Funktionsmodell der Wasserstoffbrücken im Oxyanion-Loch . . . . .	77
4.10	Ergebnisse und Diskussion - Effizienz des Acyltransfer von Aminosäureamiden	81
4.11	Ergebnisse und Diskussion - Effizienz des Acyltransfer auf Pentapeptide . . . . .	82
4.12	Ergebnisse und Diskussion - Untersuchung zur Sekundärhydrolyse ausgewählter Acyltransferreaktionen. . . . .	89
4.13	Ergebnisse und Diskussion - Kinetik der Modifizierung von MAParvulin 10.	91
4.14	Ergebnisse und Diskussion - Modifizierung von MAParvulin 10 . . . . .	92
C.1	Anhang - Nukleotidsequenzen der Trypsinvarianten . . . . .	139
C.2	Anhang - Aminosäuresequenzen der Trypsinvarianten . . . . .	142
C.3	Anhang - Aminosäuresequenzen der Parvuline . . . . .	143
C.4	Anhang - Vektoren: pST und pYT . . . . .	143
C.5	Anhang - Massenspektren der generierten Trypsinvarianten. . . . .	144
C.6	Anhang - Massenspektren der modifizierten Par10-Varianten. . . . .	145
C.7	Anhang - Chromatogramme der Trypsinvarianten . . . . .	146
C.8	Anhang - Berechnung der theoretischen Sekundärstrukturelemente . . . . .	147

C.9 Anhang - Untersuchungen der Aktivität der modifizierten Parvulin10-Varianten. . . . .	151
C.10 Anhang - Schematische Darstellung der Übergangszustände . . . . .	152

# Tabellenverzeichnis

1.1	Einleitung - Beispiele für Substratmimetika . . . . .	10
4.1	Ergebnisse und Diskussion - Reinigung der Trypsinvarianten . . . . .	47
4.2	Ergebnisse und Diskussion - Vergleich der Bestimmungen der aktiven Trypsinspezies . . . . .	51
4.4	Ergebnisse und Diskussion - Gehalt an freien Thiolen in den Trypsinvarianten	52
4.6	Ergebnisse und Diskussion - Sekundärstrukturen . . . . .	56
4.8	Ergebnisse und Diskussion - pH-Optimum . . . . .	60
4.10	Ergebnisse und Diskussion - initiale Hydrolysegeschwindigkeiten für Standardsubstrate . . . . .	62
4.12	Ergebnisse und Diskussion - initiale Hydrolysegeschwindigkeiten für ausgewählte Carbonsäurederivate . . . . .	63
4.14	Ergebnisse und Diskussion - initiale Hydrolysegeschwindigkeiten für ausgewählte Substratmimetika . . . . .	65
4.16	Ergebnisse und Diskussion - Relative initiale Hydrolysegeschwindigkeiten .	66
4.18	Ergebnisse und Diskussion - Bestimmung kinetischer Parameter . . . . .	68
4.19	Ergebnisse und Diskussion - Differenzen der Bindungsenergien der Trypsinvarianten im Vergleich zum <i>wt</i> -Trypsin . . . . .	70
4.21	Ergebnisse und Diskussion - Differenzen der Acylierungsenergien der Trypsinvariante im Vergleich zum <i>wt</i> -Trypsin . . . . .	71
4.23	Ergebnisse und Diskussion - Differenz der Deacylierungsenergie der Trypsinvarianten im Vergleich zum <i>wt</i> -Trypsin . . . . .	72
4.25	Ergebnisse und Diskussion - Liste der verglichenen Kristallstrukturen . . .	75
4.27	Ergebnisse und Diskussion - Kinetische Parameter der Acyltransferreaktionen	84
4.28	Ergebnisse und Diskussion - Maximale Aminolysegeschwindigkeiten . . . .	85
4.29	Ergebnisse und Diskussion - Maximale Aminolysegeschwindigkeiten unter nicht sättigenden Bedingungen . . . . .	88
A.1	MuM - Enzyme . . . . .	123
A.3	MuM - Molekularbiologische Kits . . . . .	124
A.5	MuM - Längenstandard/Molekülmassenstandard . . . . .	124
A.7	MuM - Stämme . . . . .	124
A.9	MuM - Oligonukleotide . . . . .	125
A.11	MuM - Vektoren . . . . .	125
A.13	MuM - Kulturmedien . . . . .	126
A.15	MuM - Antibiotika . . . . .	126
A.17	MuM - Verwendete Geräte . . . . .	127
A.19	MuM - Software . . . . .	128
A.21	MuM - Verwendete Internetseiten . . . . .	128

C.1	Anhang - Liste Ester und Peptide . . . . .	137
C.3	Anhang - Acyltransfer-Aminosäureamide . . . . .	148
C.4	Anhang - Acyltransfer-Aminosäureamide . . . . .	150
C.5	Anhang - Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren . . . . .	153

# Reaktionsschemata

1.1	Einleitung - Mechanistisches Modell der thermodynamisch kontrollierten reversen Proteolyse . . . . .	6
1.2	Einleitung - Mechanistisches Modell der kinetisch kontrollierten, reversen Proteolyse . . . . .	7
3.1	Einleitung - Mechanistisches Modell der kinetisch kontrollierten Hydrolyse durch Serinproteasen . . . . .	28

# Nomenklatur

5/6-FAM 5/6-Carboxyfluorescein

*aqua bidest* doppelt destilliertes Wasser

Abz Aminobenzoesäure

ADH Alkoholdehydrogenase

ATP Adenosintriphosphat

Boc tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe

BPTI Basischer Pankreas Trypsin Inhibitor

Bz Benzoessäure

bzw. beziehungsweise

CAIBE Chlorameisensäure-iso-butylester

CD Circular dichroismus

d. h. das heißt

DBU 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

DCM Dichlormethan

DIPEA N,N-Diisopropylethylamin oder Hünig-Base

DMF Di-Methylformamid

DNA Desoxyribonukleinsäure

DTNB Dithionitrobenzoessäure - Ellmans Reagenz

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

Et Ethylrest

FAM Carboxyfluorescein

Fmoc 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

HCTU O-(1H-6-Chlorbenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

IPTG Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid

Me Methylrest

NMR Kernspinresonanzspektroskopie

NRPS Nicht Ribosomale Peptidsynthetase

---

p. a.	<i>pro Analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SBTI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNAC	<i>S-N</i> -Acetylcysteamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Trisopropylsilanyl
TLCK	Tosyl-L-Lysinchloromethylketon
TNB	2-Nitro-5-Thiobezoat
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolettstrahlung
vgl.	vergleiche
Vis	sichtbares Licht
Vol.	Volumen
X	Heteroatom, hier N, O oder S
Xaa	Dreibuchstabencode für eine allgemeine Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe

# Zusammenfassung

Die enzymatische Ligation von Peptid- und Proteinfragmenten oder Proteinen an sich, stellt eine große Herausforderung dar. Ein wesentlicher Grund hierfür ist das Fehlen geeigneter Biokatalysatoren, welche sowohl eine ausreichende Interaktion mit dem Peptidrückgrat aufweisen als auch die Knüpfung einer Peptidbindung katalysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es möglich ist die hervorragenden Ligationseigenschaften der Surfactin-Thioesterase II auf anionisches Rattentrypsin II zu übertragen, welches seinerseits eine geeignete Interaktion mit dem Peptidrückgrat zeigt.

Während die Katalysemechanismen beider Enzyme im Wesentlichen dem der Serinesterasen entsprechen, besteht ein Unterschied in der Architektur des Oxyanion-Lochs. Dieses enthält an der entscheidenden Position in der Thioesterase ein Prolin. Diese Position wird in anderen Serinesterasen, wie auch dem Trypsin, durch ein hoch konserviertes Glycin belegt. Dieses Prolin in der Thioesterase scheint für die Acyltransfereigenschaften eine herausragende Rolle zu spielen, da eine Mutation vom Prolin zum Glycin mit dem Verlust der Ligationseigenschaften einhergeht. Hierbei stellte sich die Frage, ob man durch die Mutation des Glycins im Trypsin zum Prolin eine Protease in eine Ligase umwandeln kann.

Entsprechend dieser Frage wurden Trypsinmutanten, welche Proline im Oxyanion-Loch enthalten, erzeugt und hinsichtlich ihrer Acyltransfereigenschaften und ihrer Anwendbarkeit für die enzymatische Ligation untersucht.

Die erzeugten Trypsinvarianten wurden mit verschiedenen Substraten bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften untersucht und in Acyltransferreaktionen wurde ihr Nutzen für enzymatische Ligationsreaktionen quantifiziert. Im Ergebnis konnten deutliche Änderungen der Spezifität der Trypsinvarianten festgestellt werden, während sich die Selektivität nur unmerklich veränderte. Diese Veränderungen der Spezifität scheinen durch zwei Umstände bedingt. Zum einen ist ein Teil der erzeugten Trypsinvarianten gänzlich ungeeignet für die enzymatische Ligationsreaktion, zum anderen weisen zumindest zwei der Trypsinvarianten eine deutlich verminderte Sekundärhydrolyse auf, was diese Trypsinvarianten zu geeigneten Kandidaten für die enzymatische Peptidligation macht. Diese Unterschiede in der Spezifität gegenüber dem *wt*-Trypsin scheinen im Wesentlichen auf Veränderungen der Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes durch das Oxyanion-Loch während der einzelnen Katalyseschritten zurückzuführen zu sein. Interessanterweise ergeben sich dabei deutliche Unterschiede zwischen der Acylierungsreaktion und der Deacylierung.

Die Anwendbarkeit und der damit verbundene synthetische Nutzen der beiden Trypsinvarianten Q192P und D194P konnte abschließend in einer *N*-terminalen Proteinmodifizierung am Parvulin 10 erfolgreich bestätigt werden. Der Vorteil gegenüber dem *wt*-Trypsin resultiert aus einer signifikant erniedrigten Degradation des Zielproteins und der damit verbundenen Erhöhung der Produktausbeuten.

# **Teil I: Einleitung und Zielstellung**



# 1 Einleitung

## 1.1 Die natürliche Proteinbiosynthese

In der RCSB PROTEIN DATA BANK sind zur Zeit 145 219 Einträge für Proteinstrukturen hinterlegt [1] und in der BRAUNSCHWEIG ENZYME DATABASE (BRENDA) sind mehr als 12 263 175 Einträge für Proteinsequenzen vorhanden [2]. Wenn man bedenkt, dass diese Zahlen nur einen Bruchteil der tatsächlich existierenden Proteine widerspiegeln, erstaunt es, dass im Laufe der Evolution nur das Ribosom zu deren Biosynthese entwickelt wurde. Das Ribosom übersetzt die dafür als mRNA vorliegende genetischen Information in eine Proteinsequenz. Die mRNA wird von der kleinen Untereinheit des Ribosoms gebunden. Die große Untereinheit trägt die Peptidyltransferaseaktivität auf ihrem 23S rRNA-Bestandteil und dieser wirkt als Ribozym<sup>1</sup>. Das eigentliche Ribosom, bestehend aus großer und kleiner Untereinheit, assembliert erst nach dem Binden der mRNA. Die sich anschließende Translation kann mit einem Dreistellenmodell<sup>2</sup> erklärt werden. Eine Aminoacyl-tRNA bindet in der A-Stelle komplementär zum entsprechenden Codon und wird an die P-Stelle weitergegeben, in welcher der Acyltransfer stattfindet und mit jeder Wiederholung eine wachsende Polypeptidkette entstehen lässt. Danach wandert das Ribosom auf der mRNA ein Codon weiter und die leere t-RNA verlässt über die E-Stelle das Ribosom.

Die Bereitstellung der beladenen t-RNAs erfolgt über die Aminoacyl-tRNA-Synthetase [3]. Für den gesamten Prozess der Assemblierung und Einbindung der mRNA in das Ribosom ist eine größere Anzahl von ribosomalen Faktoren notwendig. Aufgrund der Komplexität ist eine *in vitro*-Anwendung zur Proteinbiosynthese nur bedingt möglich [4], während die *in vivo*-Anwendung mit der Einführung der Proteinüberexpression [5] eine weite Verbreitung fand.

Zahlreiche Verbesserungen in der Manipulation und Synthese von DNA erlauben es, selbst artifizielle Proteine darzustellen [6]. Aber es ist nur bedingt möglich, nicht proteinogene Aminosäuren oder deren Derivate über das Ribosom in die Proteinstruktur zu integrieren. Zwar gelang die Erweiterung des genetischen Codes schon mehrfach [7–11] und damit die Einführung nicht kanonischer Aminosäuren, aber die universelle Einführung nicht kodierter Aminosäuren ist nicht gegeben. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Aminoacyl-tRNA-Synthetase ein sehr stringentes Substratspektrum besitzt [9]. Bei der Erweiterung des genetischen Codes ist zu beachten, dass es zwischen den einzelnen t-RNAs, insbesondere den artifiziell eingeführten, zu einer Konkurrenz um die entsprechenden Codons kommen kann, wodurch die Ausbeuten richtig integrierter Aminosäuren bei kanonischen Strukturen reduziert werden [12].

<sup>1</sup>Das Ribozym ist RNA, welche katalytische Aktivität besitzt.

<sup>2</sup>Nach dem Dreistellenmodell besitzt das Ribosom drei tRNA-Bindungsstellen, die A-(Aminoacyl-), P-(Peptidyl-) und E-(Exit-)Stelle. Diese drei Bindungsstellen sind während der Elongation jeweils oszillierend in den Mechanismus involviert.

## 1.2 Anthropogene Proteinsynthese

### 1.2.1 Peptidsynthese und deren chemische Ligation

Will man, im Rahmen eines Proteindesigns oder einer Proteinmodifizierung, nicht codierte Aminosäuren oder andere artifizielle Reste in ein Protein einführen, kann man auf die von MERRIFIELD eingeführte Festphasenpeptidsynthese (vgl. Abbildung 1.1) zurückgreifen [13]. Diese ermöglicht es, durch eine geeignete Schutzgruppen-Strategie annähernd jede Form von Modifizierung schon während der Synthese gezielt einzuführen [14].

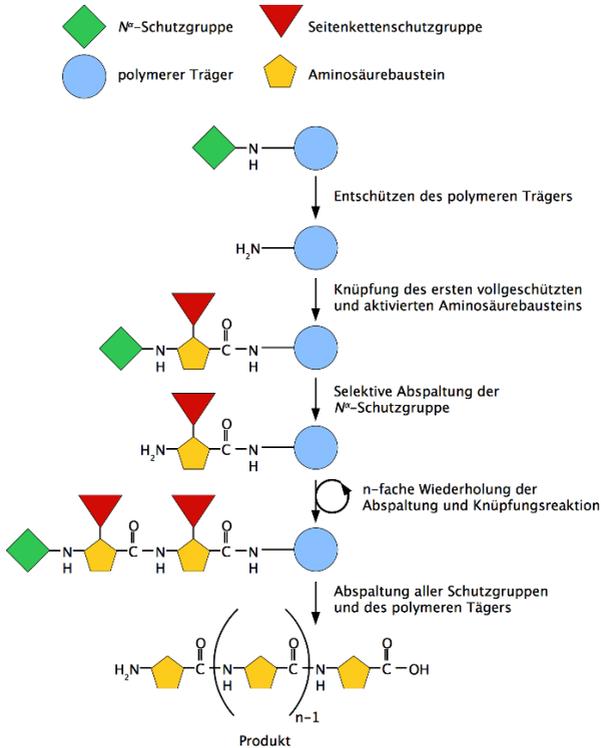
Einen weiteren Meilenstein in der Peptidsynthese stellt die, ebenfalls von MERRIFIELD eingeführte, automatisierte Peptidsynthese dar [15, 16]. Diese ermöglicht die Totalsynthese von Proteinen mit bis zu 124 Aminosäuren in einem angemessenen Zeitrahmen [15, 16]. Synthesen mit einer Kettenlänge von 50-80 Aminosäuren sind Standard [17]. Ein Grund für diese Limitierung ist die Bildung von Rumpf- bzw. Fehlsequenzen. Um dennoch die Synthese von Proteinen mit einer größeren Anzahl an Aminosäuren zu gewährleisten, haben sich eine Reihe von chemischen Ligationsverfahren etabliert. Die verschiedenen Ligationsverfahren ermöglichen die Kondensation von Peptidfragmenten zum vollständigen Protein, wodurch die Bildung von Rumpf- und Fehlsequenzen herabgesetzt werden kann. Neben der Oxim- oder Hydrazon- [18, 19], der Thioester- [20], der Thiazolidin- [21], der STAUDINGER- [22, 23] und anderen Ligationen haben sich die natürlich chemische Ligation, die erweiterte natürlich chemische Ligation und die *Expressed-Protein-Ligation* als besonders nützlich erwiesen [24, 25].

Bei der natürlich chemischen Ligation wird ein Cystein an der Ligationsstelle benötigt. Dieses wird mit einem C-terminalen Thioester umgesetzt. Es entsteht ein Cystein-Thioester, welcher wiederum nukleophil, unter Ausbildung eines intermediären 5-Rings, mit dem  $N^{\alpha}$  des Cystein substituiert werden kann. In der Folge entsteht eine Peptidbindung [26, 27]. Die erweiterte natürlich chemische Ligation ergänzt diese Reaktion um die Verwendung von -X-Gly- und -Gly-X-Ligationsstellen [28, 29]. Darüber hinaus kann bei der erweiterten Form die Ligation mit  $N^{\alpha}$ -(Ethanthiol)-Peptiden oder  $N^{\alpha}$ -(Oxyethanthiol)-Peptiden erfolgen. Sowohl die natürlich chemische Ligation als auch die erweiterte natürlich chemische Ligation kann in wässrigen Systemen bei pH 7 durchgeführt werden und stellen damit eine besonders schonende Ligationsmethode dar. Als eine Sonderform der natürlich chemischen Ligation gilt die *Expressed-Protein-Ligation*. Dabei wird unter Verwendung des natürlichen *Splice-Mechanismus*<sup>3</sup> von exprimierten Proteinen der notwendige Thioester generiert, welcher in einem zu der natürlich chemischen Ligation homologen Mechanismus umgesetzt wird [25, 30].

Trotz der schon häufig erfolgreich mit den oben genannten chemischen Methoden gezeigten Totalsynthesen [18–20, 30, 31] ist es bisher nicht gelungen, auch unter Verwendung sehr aufwendiger Schutzgruppen-Strategien bei der Peptidsynthese von Fragmenten, Racemisierung und die damit verbundene Bildungen von Enantiomerengemischen vollständig zu unterdrücken. Dies ist der Notwendigkeit geschuldet, dass die  $\alpha$ -Carboxylfunktion für die chemischen Verknüpfungen aktiviert werden muss [32–34]. Die hieraus resultierenden

---

<sup>3</sup>*Splice-Mechanismus* bezeichnet einen natürlichen Vorgang, bei welchem in einer intramolekularen Reaktion ein Teil der Proteinsequenz aus dem Protein während der Reifung entfernt wird. Dabei wird der C-Terminus des vorangegangenen Segments (*Extein*) mit dem N-Terminus des, auf das austretende Segment (*Intein*), folgenden Segments (*Extein*) verknüpft. Dieser Mechanismus erfolgt autokatalytisch und ist an Cystein- und Serin-Strukturen gebunden.



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung des Prinzips der Festphasenpeptidsynthese nach MERRIFIELD [15].

Produkte zeigen meist nicht mehr die erwarteten Eigenschaften in Bezug auf Aktivität und Struktur. Auch die Verwendung der *Expressed-Protein-Ligation* für die Kondensation von zwei rekombinant hergestellten Fragmenten kann die Racemisierung nicht umgehen, da ebenfalls die Aktivierung der  $\alpha$ -Carboxylfunktion nicht stereoselektiv verläuft [29]. Dieses Problem ist bei der Verwendung des ribosomalen Expressionssystems nicht gegeben, da das Ribosom bzw. die Aminoacyl-tRNA-Synthetase enantio- und stereoselektiv arbeiten. Aus den oben genannten Gründen (siehe 1.1) ist aber die Verwendung des Ribosoms, besonders für die Einführung artifizier Aminosäuren und Bausteine in die Proteinstruktur, nicht immer möglich.

Um dennoch die Vorteile der Peptidsynthese nach MERRIFIELD und die Enantio- und Stereoselektivität von Enzymen verknüpfen zu können, wurden semisynthetische Verfahren etabliert, bei welchen die Ligation, in Analogie zu den chemischen Segmentkondensationsreaktionen, durch Proteine katalysiert werden. Zur Bereitstellung entsprechender Biokatalysatoren wurden einige Anstrengungen unternommen [35–37], welche im folgenden Abschnitt 1.2.2 erläutert werden sollen.

## 1.2.2 Enzymatische Ligationsverfahren

### Reverse Proteolyse

Der Begriff „reverse Proteolyse“ geht auf BERGMANN zurück, welcher in seinen Arbeiten die direkte Umkehr der katalytischen Hydrolyse durch Proteasen für die Nutzung zur enzymatischen Synthese beschrieben hat [38–41].

Der Vorteil der reversen Proteolyse besteht darin, dass die Reaktionen regio- und enantioselektiv verlaufen. Zudem ist die reverse Proteolyse zumeist im wässrigen System unter milden und damit verbunden ökologisch und ökonomisch vorteilhaften Bedingungen möglich [39, 40]. Zwar sind Proteasen durch ihre natürliche Funktion keine idealen C-N-Ligasen, dennoch stellen sie durch ihre Substratspezifität, Regioselektivität und die Interaktion mit dem Peptidrückgrat sehr gute Kandidaten für Ligationsreaktionen dar [36]. Ein weiterer Vorteil der Proteasen ist der schon weitverbreitete kommerzielle Einsatz [42]. So finden sie in großen Bereichen der Lebensmittelindustrie Anwendung [43–46]. Ebenso finden sie Verwendung in der Lederverarbeitung [47], in der Waschmittelindustrie [48] und in der Medizin [49, 50].



**Reaktionsschema 1.1** Mechanistisches Modell der thermodynamisch kontrollierten reversen Proteolyse:  $K_{\text{ion}}$  als Gleichgewichtskonstante zwischen ionisierter Form und nicht ionisierter Form der Reaktanten und  $K_{\text{lig}}$  als Gleichgewichtskonstante zwischen kondensierter bzw. ligierter Form der Reaktanten. Nach dem Modell von JAKUBKE und SCHELLENBERGER [51, 52].

Die reverse Proteolyse wird dabei grundlegend nach dem Reaktionsverlauf der verwendeten Protease in die thermodynamisch kontrollierte (gleichgewichtskontrollierte) oder die kinetisch kontrollierte Katalyse unterteilt. Während die kinetisch kontrollierte Katalyse im Wesentlichen dem Reaktionsmechanismus der Serin- und Cystein-Proteasen zuzuordnen ist, wird das gleichgewichtskontrollierte Modell auf alle anderen Proteasen<sup>4</sup> angewendet. Im gleichgewichtskontrollierten Modell ist der Verlauf der Reaktion ausschließlich von den thermodynamischen Bedingungen der Reaktion bzw. vom Massenwirkungsgesetz abhängig. Bedingt durch diesen Zusammenhang ist bei dieser Art der Reaktion hauptsächlich mit den Produkten zu rechnen, die thermodynamisch am stabilsten sind. Im Falle der Proteasen sind das die Hydrolyseprodukten der Peptide. Da jedoch das Massenwirkungsgesetz die Reversibilität der Reaktion nach VAN'T HOFF [53] einschließt, was durch BERGMANN [39, 40] bestätigt werden konnte, lässt sich diese Reaktion auch in umgekehrter Richtung beeinflussen. Dabei verläuft die Kondensationsreaktion zwischen einer freien Carboxylfunktion und einer nukleophilen  $N^{\alpha}$ -Aminofunktion endergon und ist thermodynamisch nicht begünstigt. Da die ionisierten Formen der Reaktionskomponenten nicht reaktiv sind, müssen für die thermodynamisch kontrollierte Reaktion zwei Gleichgewichte berücksichtigt werden, zum einen die Überführung der Ionen in die nicht ionisierte Form und zum anderen die Kondensationsreaktion selbst. Die Protease als Katalysator spielt dabei nur eine Rolle für die Geschwindigkeit mit der die Gleichgewichte eingestellt werden

<sup>4</sup>Hierbei sind im Wesentlichen die Carboxylproteasen, bestehend aus Aspartyl- und Glutamyl-Proteasen, und die Metalloproteasen zu nennen.



te deacyliert wird. Die Deacylierung durch die Aminokomponente muss in diesem Fall bevorzugt gegenüber der Deacylierung durch Wasser erfolgen [36, 51, 54] (vgl. Reaktionsschema 1.2). Zudem ist die Protease-katalysierte Peptidsynthese in mannigfaltiger Weise manipulierbar. Dabei sind im Besonderen zu erwähnen: die Lösungsmitteloptimierung, die Substratanpassung und das Enzymdesign.

## Optimierungsmöglichkeiten der Protease-katalysierten Peptidsynthese

**Lösungsmitteloptimierung** Die Optimierung der Lösungsmittel zielt bei der Protease-katalysierten Peptidsynthese im Wesentlichen darauf ab unerwünschte Hydrolyse zu unterdrücken. Dies beruht auf der Verdrängung von aktivem Wasser<sup>5</sup> aus dem Reaktionsansatz [56]. Es finden verschiedene Systeme Anwendung. Das wässrige System kann beispielsweise schrittweise durch ein organisches Lösungsmittel ersetzt werden [37, 57, 58]. Dies hat den Vorteil, dass einerseits Peptidsubstrate besser löslich sein können und andererseits die Bedingungen nicht zu drastischen Veränderung der Enzymstruktur führen.

Wenn man die Substitution des Lösungsmittel kontinuierlich bis zum Einsatz reinen Lösungsmittels führt<sup>6</sup>, kann man von stark verbesserten Ligationsausbeuten ausgehen [59–61]. Allerdings führt dies unter Umständen dazu, dass die Enzymstruktur beeinträchtigt wird. In der Konsequenz erhält man verlängerte Reaktionszeiten und kürzere Halbwertszeiten des Katalysators, was den Einsatz großer Enzymmengen zur Folge hat [62, 63]. Als Alternative kann die Reaktion im gefrorenen System betrachtet werden. Der Vorteil besteht darin, dass das Enzym sein natürliches Lösungsmittel nicht verlässt, aber dennoch kein aktives Wasser mehr für die Hydrolyse zur Verfügung steht. Auch hier ist mit signifikant erhöhten Produktausbeuten zu rechnen. Allerdings führt diese Methode ebenfalls zu deutlich erhöhten Reaktionszeiten, was zur Kompensation einen erhöhten Bedarf an Katalysator voraussetzt [64–69].

**Substratanpassung** Die zweite Optimierungsstrategie bezieht sich auf die Optimierung des Substrates. Dabei hat sich das Substratmimetikakonzept als besonders erfolgreich herausgestellt. Bei diesem Konzept wird die selektivitätsdeterminierende Gruppe einer Aminosäure aus dem Acylrest in die Esterabgangsgruppe verlagert (vgl. Tabelle 1.1).

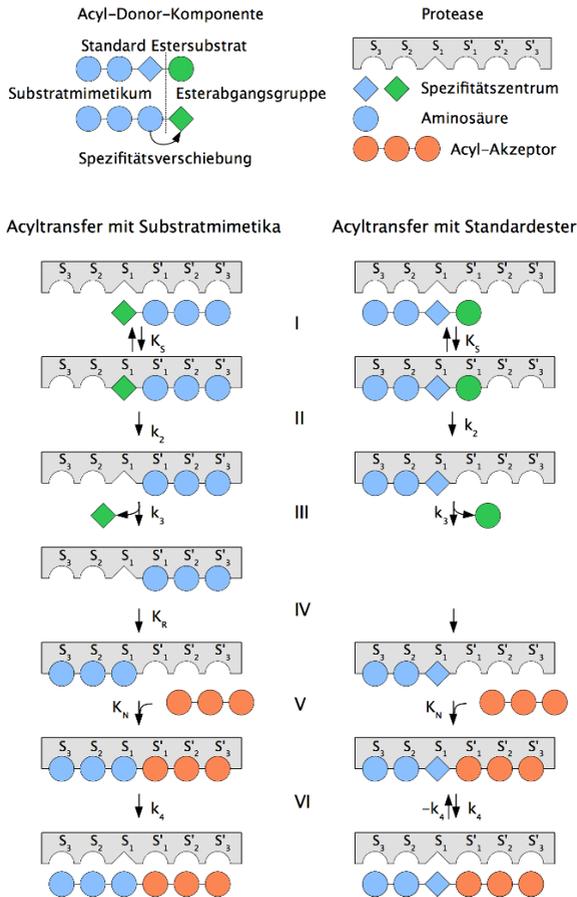
Dies führt zu einem Verlust der Spezifität im resultierenden Acyltransferprodukt. Bedingt durch die fehlende Spezifität zum Produkt ist eine Hydrolyse des Produktes nicht mehr möglich (siehe Abbildung 1.2). Diese spezielle Art der Substratmanipulation erlaubt es, neben unspezifischen, proteinogenen Aminosäuren, auch nicht proteinogene Acylreste, wie beispielsweise *D*-Aminosäuren, oder nicht peptidische Acylreste einzuführen [64, 70–74]. Eine Besonderheit, die sich hierbei ergibt, ist die Verschiebung der selektivitätsdeterminierende Gruppe vom  $S_1$ -Bindungsort<sup>7</sup> in den  $S_1'$ -Bindungsort. Dazu muss das Substrat invers eingebunden werden, bevor es zur Acylierung kommt. Allerdings setzt das voraus,

<sup>5</sup>Die Autoren beschreiben aktives Wasser als für die Aktivität essentielle Wasserschicht um die Biokatalysatoren [55].

<sup>6</sup>In Abhängigkeit vom Enzym genügen zum Teil kleine Anteile an Lösungsmitteln.

<sup>7</sup>Bei der Nomenklatur nach SCHECHTER UND BERGER werden die Aminosäurereste des peptidischen Substrates von der Peptidasespaltstelle aus in Richtung *N*-Terminus mit  $P_1$ - $P_n$  bezeichnet, in Richtung *C*-Terminus mit  $P_1'$ - $P_n'$ . Die Substratbindetaschen für die Seitenketten der Aminosäurereste werden entsprechend mit  $S_1$ - $S_n$  bzw.  $S_1'$ - $S_n'$  bezeichnet [75].

dass vor dem Deacylierungsschritt, durch Aminolyse oder Hydrolyse, eine Umlagerung des Acylrestes stattfindet [76]. Ein Schema dieses Vorgangs zeigt Abbildung 1.2.

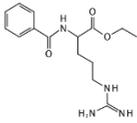
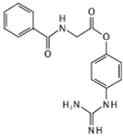
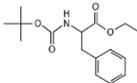
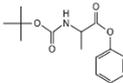
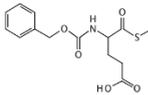
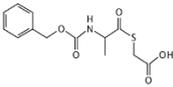


**Abbildung 1.2** Vergleich des schematischen Ablaufs der Protease-katalysierten, kinetisch kontrollierten Acyltransferreaktion mittels Substratmimetika und Standardestersubstrat. I. und II. Anlagerung des Substrates an das Enzym (Nomenklatur der Bindungstaschen nach SCHECHTER und BERGER [75]) unter Bildung des MICHAELIS-MENTEN-Komplexes. III. Spaltung des Esters unter Ausbildung des Acylzymintermediates. IV. Umlagerung des Acylrestes nach THORMANN [76]. V. und VI. Anlagerung und nukleophiler Angriff einer N<sup>α</sup>-Aminokomponente unter Freisetzung des Acyltransferproduktes und des freien Enzyms.

Der synthetische Nutzen dieser Methode konnte schon mehrfach gezeigt werden [61, 77–79]. Es gelang diese Methode durch Variation der Abgangsgruppe für eine Vielzahl von

Proteasen verfügbar zu machen und somit ein breites Spektrum an Ligationsschnittstellen zu erschließen. Dennoch führt das Substratmimetikakonzept nicht zu einer Unterbindung der Sekundärhydrolyse. Zwar entsteht durch die Ligationsreaktion keine primäre Schnittstelle, jedoch ist aufgrund der Spezifität<sup>8</sup> der Protease ein Hydrolyse an andere Stelle der Ligationsfragmente nicht ausgeschlossen. Daher ist es wünschenswert Proteasen zu generieren, welche eine unikale Schnittstellenerkennung aufweisen.

**Tabelle 1.1** Ausgewählte Ester für die Verschiebung des Selektivitätszentrums vom Acylrest im Standardsubstrat in die Esterabgangsgruppe im Substratmimetikum unter Angabe des jeweilig spezifischen Enzyms.

Standardsubstrat	Substratmimetikum	Enzym/Quelle
		Trypsin/ Chymotrypsin [64, 81]
		Chymotrypsin [82]
		V8-Protease [64, 67]

**Enzymdesign** Um eine, wie im vorherigen Abschnitt beschriebene, Protease mit unikaler Schnittstelle zu generieren, ist es in den meisten Fällen notwendig die Substratselektivität der Protease selbst zu verändern. Tatsächlich konnten bei Trypsin einige interessante Veränderungen in der Selektivität<sup>9</sup> gezeigt werden, so war es möglich die Selektivität für basische Reste [83, 84] in eine Selektivität für aromatische Reste umzuwandeln, was wiederum der Primärselektivität von Chymotrypsin ähnelt. Diese Veränderung gelang durch rationelles Enzymdesign und eine entsprechende, gerichtete Mutagenese [85]. Ähnliche Selektivitätsänderungen konnten beispielsweise für Trypsin hin zu einer Elastase-selektivität gezeigt werden [86]. Leider zeigen diese Variationen nur den prinzipiellen Weg der Selektivitätsänderung, praktisch sind diese Änderungen nicht von Bedeutung. Zwar kann der  $K_m$ -Wert für entsprechende Substrate gesenkt werden, aber der  $k_{cat}$ -Wert erfährt eine Erniedrigung gegenüber dem imitierten Wildtypenzym. Um einen Nutzen für die

<sup>8</sup>Die Spezifität von Enzymen wird durch die präzise Anordnung der katalytisch aktiven Reste erreicht. Diese werden an eine bestimmte Stelle im Substrat gebracht, so dass nur dort die Reaktion ablaufen kann. Daraus folgt eine hohe Regio- und Stereoselektivität. Spezifität beschreibt wie chemo-, regio-, und stereoselektiv eine Reaktion abläuft [80].

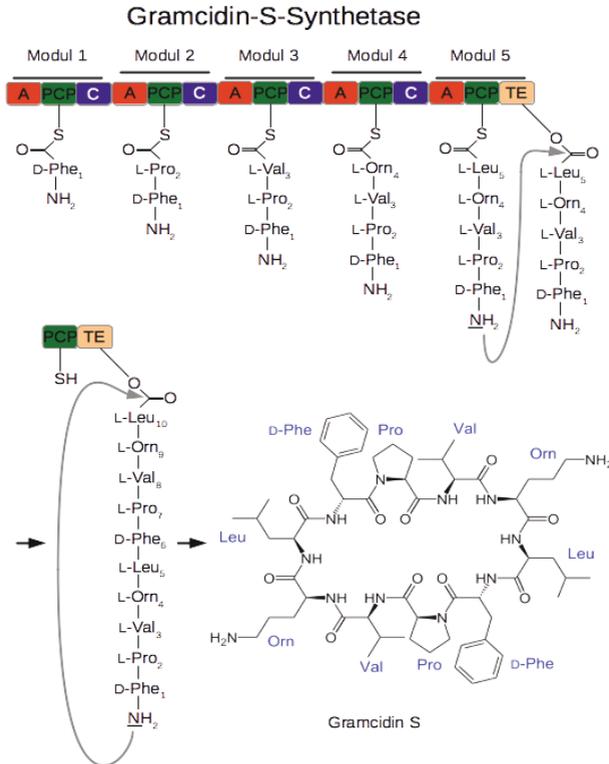
<sup>9</sup>Die Selektivität der Enzyme hängt mit der selektiven molekularen Erkennung der Substrate durch die chirale aktive Tasche zusammen. Hier hinein passen nur bestimmte Substrate [80].

enzymkatalysierte Peptidsynthese zu erhalten, ist es an dieser Stelle nicht sinnvoll den P-Bereich (Fußnote 7 auf Seite 8) der Proteasen zu optimieren bzw. zu verändern, da dies im Wesentlichen nur eine Variation des natürlichen Selektivitätszentrums der Proteasen darstellt. Vielmehr wäre es sinnvoll das Selektivitätszentrum der Proteasen, nach Möglichkeit, auf den P<sup>1</sup>-Bereich zu erweitern. Eine Verlagerung der Selektivität bedingt eine höhere Akzeptanz für die Acylakzeptorkomponente, was wiederum eine Verschiebung von der Acyldonor-Abspaltung durch Hydrolyse hin zur Aminolyse nach sich ziehen würde und somit gesteigerte Acyltransferaten erreicht werden könnten [86, 87]. Ein Beispiel für diese Erweiterung zeigt die von WILLET [88, 89] eingeführte Selektivität von Trypsin für Histidin in der S<sub>2</sub>'-Position. Durch das Einfügen zweier artifizierender Histidine am Rand des S<sub>2</sub>'-Bindungsortes konnte eine Komplexierung eines Histidins in P<sub>2</sub>'-Position des Substrates, vermittelt durch ein Zink- bzw. Kupferion, erreicht werden. Ebenso gelang es mit der Trypsinvariante D189K/K60E einen für die Segmentkondensation interessanten Kandidaten bereitzustellen [61]. Diese Variante zeigt eine Verschiebung der Selektivität von Arginin zu Tyrosin in der P<sub>1</sub>-Position und eine Verschiebung von Methionin zu Arginin in der P<sub>1</sub>'-Position im Substrat. Dies ermöglicht eine verbesserte Akzeptanz der zur Deacylierung des Enzyms notwendigen nukleophilen Aminokomponente. Hierbei konnten erfolgreich N-terminal Modifizierungen von RNase A und Parvulin gezeigt werden [79, 90, 91]. Die logische Kombination aus der von WILLET vorgestellten Trypsinvariante mit Histidin-Selektivität in P<sub>2</sub>'-Position und der Doppelvariante des Trypsin D189K/K60E führt zu der Vierfachtrypsinvariante K60E/N143H/E151H/D189K, welche eine Präferenz für Substrate hat, die die Kombination der beiden Einzelvarianten darstellt. Somit erhält man ein Trypsin mit einer Selektivität für Substrate mit der Sequenz Tyrosin (P<sub>1</sub>), Arginin (P<sub>1</sub>') und Histidin (P<sub>2</sub>'). Hierbei verlagert sich ein beträchtlicher Teil der Substratselektivität von der S<sub>1</sub>-Position in die S'-Region, so dass eine verbesserte Acyltransferate erreicht werden kann, bedingt durch die besser Akzeptanz des Acylakzeptors. In Kombination mit dem oben beschriebenen Substratmimetikakonzept führt dies zu erstaunlichen Ergebnissen bei der N-terminalen Modifikation von Proteinen<sup>10</sup>. Prinzipiell ist auch die C-terminale Modifizierung bzw. Segmentkondensation möglich [78]. Es ergibt sich jedoch das Problem, dass entweder der C-terminale Ester erzeugt werden muss oder beim Acyltransfer aus einer peptidischen Struktur die Erkennungssequenz erhalten bleibt und somit Produkthydrolyse stattfinden kann. Die Erkennungssequenz selbst muss dabei in der Struktur vorhanden sein oder in einem vorangegangenen Schritt eingeführt werden. In Abhängigkeit von der verwendeten Protease führt dies unter Umständen zu einer veränderten Proteinsequenz, welche nicht immer erwünscht ist.

### Alternative Enzyme für die enzymkatalysierte Peptidsynthese.

In den letzten Jahren wurden besonders zwei Enzyme im Bezug auf ihren Nutzen für die Peptidsynthese diskutiert. Zum einen ist das die Thioesterase, welche ein integraler Bestandteil der nichtribosomalen Peptidsynthetase ist, und zum anderen die Sortase.

<sup>10</sup>Die Modifikation bzw. die Modifizierung von Proteinen beschreibt die Veränderung von Proteinen nach der Translation. Bei der in dieser Arbeit betrachteten reversen Proteolyse unterscheidet man zwischen N- und C-terminaler Modifizierung. Der Unterschied zwischen beiden Modifizierungen liegt in der Bereitstellung des Acylrestes der übertragen wird. Während bei der N-terminalen Modifizierung ein Acylrest auf ein Protein übertragen wird, stellt für die C-terminale Modifizierung das Protein selbst den Acylrest bereit, der übertragen wird [37, 92, 93].



**Abbildung 1.3** Schematische Darstellung der Funktion der Gramicidin-S-Synthetase, bestehend aus den 2 NRPS's GrsA und GrsB, mit den jeweiligen Modulen, den Domänen (A - Adenylierungsdomäne, PCP - Peptidylträgerdomäne, E - Epimerisierungsdomäne, C - Kondensationsdomäne und TE - Thioesterasedomäne) und der schematischen Darstellung der Cyclisierung durch die Thioesterase. Abbildung erstellt nach [94].

**Sortase** Die Sortase, welche in ihrer natürlichen Funktion für die kovalente Verknüpfung von Proteinen mit der Zellwand in grampositiven Bakterien verantwortlich ist [95, 96], ist ein Enzym, welches eine hervorragende Interaktion mit dem Peptidrückrat aufweist und eine Transpeptidase-Aktivität besitzt [96]. Diese Eigenschaften machen sie zu einem geeigneten Kandidaten für eine erfolgreiche Proteinmodifikation bzw. für entsprechende Ligationsreaktionen. Die Sortase selbst ist eine Cysteintypeptidase, welche durch die Spaltung von LPXTG-Motiven nach dem Prinzip der Serin- bzw. Cysteintypeptidasen zu einem acylierten Übergangszustand führt. Dieser kann wiederum durch den Angriff eines Nucleophils, im natürlichen Medium durch den peptidischen Anteil des Murein-Sacculus<sup>11</sup>, deacyliert werden und führt zum Transpeptidaseprodukt. Das LPXTG-Motiv wird zwischen dem Threonin und Glycin gespalten und stellt ursprünglich das Verbindungsstück

<sup>11</sup>Der Murein-Sacculus ist die aus Peptidoglycanen aufgebaute Zellwand von Bakterien [97-99].

zwischen dem über den SEC-Weg<sup>12</sup> transportierten und an einen Membrananker gebundenen Zielprotein dar. Die Erkennungssequenz des Nucleophils bildet ein Pentaglycin. Sowohl das Pentaglycin als auch das LPXTG-Motiv sind dabei hochkonservierte Erkennungssequenzen [95, 96, 101, 102]. Die praktische Nutzbarkeit dieses Katalysators konnte schon häufig bewiesen werden [93, 103, 104]. Dennoch bleiben zwei Nachteile: zum einen ist die Erkennungssequenz hochkonserviert, damit die hydrophoben Reste, welche das aktive Zentrum umgeben, für eine Minimierung des Wasseranteils im Reaktionsverlauf sorgen [95, 105]. Zum anderen erhält man bei Sortase-katalysierten Acyltransferreaktion in Modellsystemen Ausbeuten um die 30 % bzw. 50-90 %, in Abhängigkeit von der Anzahl der *N*-terminalen Glycine der nucleophilen Komponente [103], so dass eine vollständige Acyltransferreaktion nicht möglich scheint.

**Nichtribosomale Peptidsynthetase** Das zweite Enzym, dessen Nutzbarkeit in den letzten Jahren für die Peptidsynthese untersucht wurde, ist die Thioesterase. Dieses Enzym ist Teil der nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS's), welche von SCHELLENBERGER und JAKUBKE aufgrund ihres modularen Aufbaus und den damit verbundenen Restriktionen für die enzymkatalysierte Peptidsynthese ausgeschlossen wurden [36]. Dennoch zeigen die NRPS's einige bemerkenswerte Eigenschaften. In ihrer natürlichen Funktion dienen sie der Synthese von zyklischen Peptidantibiotika, wie zum Beispiel Gramcidin S, Vancomycin, Bacillibactin oder Cyclosporin [106]. In ihrem Grundgerüst folgen die NRPS's, wie in Abbildung 1.3 gezeigt, einem modularen Aufbau. Dabei übernimmt jedes Modul die Verknüpfung einer einzigen Aminosäure oder eines einzelnen Bausteins [107, 108]. Diese werden jeweils spezifisch von der Adenylierungsdomäne erkannt, unter ATP-Verbrauch als Aminoacyladenylat aktiviert und auf die *Peptidyl Carrier Protein*-Domäne (PCP) übertragen. Die Aminosäure liegt nun gebunden als Thioester vor, wobei der Cofaktor 4'-Phosphopantethein als Anker in der PCP dient. In den sich anschließenden Reaktionen werden die Aminoacylintermediate von der Kondensationsdomäne auf die folgende PCP-Domäne übertragen. Es entsteht unter Ausbildung einer Peptidbindung ein Peptidylintermediat. Nach Durchlaufen der einzelnen Domänen endet die Elongation des Peptides. Man spricht vom sogenannten Fließbandmechanismus [106]. Durch die Thioesterase-Domäne kommt es zur Termination des Prozesses. Diese Domäne greift die Thioesterbindung des Peptidylrestes der letzten PCP-Domäne durch ein Serin, unter Ausbildung einer Oxoesterbindung, an. Anschließend erfolgt die Makrozyklisierung und Abspaltung vom Multienzymkomplex zum Lactam oder Lactonring (siehe Abbildung 1.3) [109, 110]. Zwar ist die universelle Nutzung der NRPS's durch die spezifische Erkennung der Aminosäuren durch die Adenylierungsdomäne für die enzymatische Peptidsynthese nicht gegeben und ebenso setzt die Modularisierung Grenzen für die Länge der zu synthetisierenden Produkte, dennoch scheint zumindest die Thioesterasedomäne ein potentieller Kandidat für die enzymkatalysierte Peptidligation zu sein [109], was im folgenden Abschnitt geklärt werden soll.

**Die Thioesterase** Diese letzte Domäne der NRPS's, die Thioesterasedomäne, wird aufgrund ihrer strukturellen Charakterisierung den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen zugeordnet [111, 112]. Die Zyklisierungsreaktion, welche durch die Thioesterase katalysiert wird, verläuft in einem den Serinproteasen ähnlichen Mechanismus. Daher verfügt die Thioesterase über eine

<sup>12</sup>Der SEC-Weg ist ein Transportweg für Proteine aus dem Endoplasmatischem Reticulum in den extrazellulären Raum [100].

katalytische Triade bestehend aus einem Aspartat-, einem Histidin- und einem Serin-Rest [106, 111, 113]. Bei der Reaktion erfolgt der nukleophile Angriff der Serinseitenkette auf das lineare Peptid, welches als Thioester an der PCP-Domäne gebunden ist. Durch Spaltung des Thioesters wird der Acyldonor auf den Serinrest, unter Ausbildung einer Oxosterbindung übertragen. Das ausgebildete Acylenzymintermediat wird daraufhin selbst durch ein Nukleophil angegriffen und vom Serin abgespalten. Es ist zu beachten, dass sowohl ein Wassermolekül angreifen kann, was zu einem linearen Hydrolyseprodukt führt, als auch eine Aminofunktion Reaktant sein kann. Jedoch führt nur der intramolekulare Angriff einer Aminofunktion zum Zyklisierungsprodukt, wohingegen der intermolekulare Angriff mehrerer vom *Cluster*<sup>13</sup> synthetisierter Peptidylintermediate in einer *head-to-tail*<sup>14</sup>-Kondensation endet [106, 114]. Bei dieser Reaktion wird ein tetrahedraler Intermediatzustand durchlaufen, welcher dem der Serinproteasen ähnelt. Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass die Thioesterase unabhängig von den Synthetasedomänen aktiv ist. Dies ermöglicht zum einen die genauere biochemische und mechanistische Analyse und zum anderen stellt sie ein Werkzeug zur Zyklisierung von Peptidantibiotika zur Verfügung [94, 108, 109]. Ein weiterer Vorteil, der sich hierdurch ergibt, ist die Möglichkeit der enzymkatalysierten Peptidligation. Dafür haben sich insbesondere Ester etabliert, welche als *S-N*-Acetylcysteamin-Thioester (SNAC) vorliegen [94, 115–117]. Diese imitieren die 4'-Phosphopantethein-Struktur des PCP-gebundenen Peptides. Auffällig ist an dieser Stelle, dass die isolierte Thioesterase einen, im Vergleich zur Thioesterasedomäne der nichtribosomalen Peptidsynthetase, erhöhten Anteil an hydrolysiertem Produkt erzeugt, welcher aber wie bei den Proteasen durch die Verwendung von alternativen Lösungsmitteln zurückgedrängt werden kann [118, 119]. Trotz dieser Verschlechterung im Ligationsverhalten sind immer noch, vor allem für die Zyklisierungsreaktion Ausbeuten von über 90 % möglich [110, 115, 118–120]. Dennoch ist die Substratspezifität der Thioesterase nicht vollständig geklärt. So wurden zwei prinzipielle Möglichkeiten für die Substrateinbindung, auf der Grundlage von Arbeiten mit der *Surfactin*-Thioesterase-Domäne, vorgeschlagen. Das erste Modell beschreibt das Einbinden des Substrates nur unter Einbeziehung der an der Zyklisierung beteiligten Reste, während der größte Teil des Substrates nicht an einer Interaktion beteiligt ist und aus dem aktiven Zentrum herausragt [121]. Das zweite Modell beschreibt das Einbinden des gesamten Substrates in eine wannenförmige Tasche und setzt eine Interaktion des gesamten Substrates mit der Thioesterase voraus [112]. Bedingt durch die spezifische Art der Substrateinbindung scheint die allgemeine Anwendbarkeit der Thioesterase für die enzymkatalysierte Peptidligation bzw. Proteinmodifizierung, trotz hervorragender Eigenschaften zur *C-N*-Bindungsknüpfung, nicht gegeben zu sein.

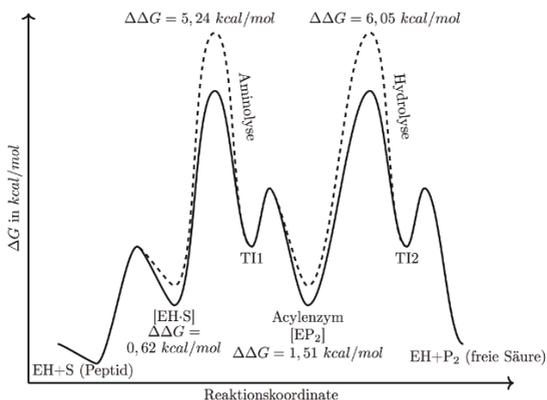
### 1.3 Vorstellung des Konzepts

Wie unter Abschnitt 1.2.2 erörtert, stellen die kinetisch kontrollierten Proteasen ein gutes Werkzeug für die enzymatische Peptidligation dar [36]. Dennoch sind sie wegen der ebenfalls erläuterten Limitationen keine universellen Katalysatoren, um Peptidbindungen zu

<sup>13</sup>Cluster meint an dieser Stelle die Gesamtheit der Module der nichtribosomalen Peptidsynthetase außer der Thioesterase.

<sup>14</sup>Diese Kopf-zu-Schwanz-Kondensation beschreibt den Angriff des *N*-Terminus eines Peptidylrestes, welcher noch an einer PCP-Domäne gebunden ist, auf das Acylenzymintermediat der Thioesterase. Es entsteht dabei ein Peptid mit sich wiederholender Sequenz.

knüpfen. Obwohl die Thioesterase diese Einschränkungen nicht aufweist, kann auch sie nicht als Idealfall für die Knüpfung von Peptidbindungen, aufgrund der sehr speziellen Substratbindung, angesehen werden [94]. Um die Nachteile beider Biokatalysatoren zu überwinden, würde es sich anbieten die Vorteile beider Katalysatoren zu vereinen. Zwischen den Katalysemechanismen der Thioesterase [112–120] und den kinetisch kontrollierten Proteasen, insbesondere den Serinproteasen [122–124] bestehen Ähnlichkeiten. Man kann allerdings auf Unterschiede in den kinetischen Teilkonstanten von Aminolyse und Hydrolyse während der Deacylierung schließen [115, 122, 124–126]. Durch veränderte Katalysegeschwindigkeiten könnte die Aminolyse gegenüber der Hydrolyse begünstigt sein und so der Thioesterase zu ihren hervorragenden Acyltransfereneigenschaften verhelfen, während die Proteasen die hydrolytische Spaltung der Substrate präferieren.

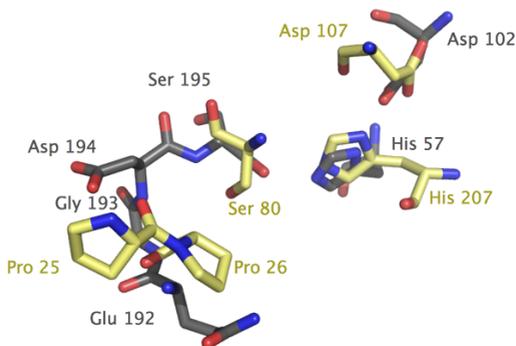


**Abbildung 1.4** Relative Energien der Übergangszustände während des Reaktionsverlaufs von Chymotrypsin (durchgängige Linie) und Methylchymotrypsin (gestrichelte Linie) zur Synthese von Z-YGGFL-NH<sub>2</sub> aus Z-YGGF-OCH<sub>2</sub>CN und L-NH<sub>2</sub> [127]. Die Ausbeuten dieser Reaktion liegen bei 56 % durch Chymotrypsin und bei 99 % durch Methylchymotrypsin, wobei die Aktivität von Methylchymotrypsin gegenüber Estersubstraten eine 5-fach niedrigere Aktivität als Chymotrypsin aufweist [127]. Die Aminolyse wird durch Methylchymotrypsin gegenüber der Hydrolyse favorisiert. Abbildung erstellt nach [128].

Ein Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten und die Folgen für das Aminolyse-Hydrolyse-Verhältnis kann am Vergleich von Chymotrypsin mit Methylchymotrypsin abgeschätzt werden. Aufgrund der Methylierung des an der katalytischen Triade beteiligten Histidins an der Seitenkette besitzt das Methylchymotrypsin eine um den Faktor 5 verringerte katalytische Effizienz gegenüber dem unmodifizierten Chymotrypsin bei der Umsetzung von Estersubstraten und ist nicht aktiv gegenüber Amidsubstraten [127, 128]. Dieser Unterschied in den Aktivitäten resultiert aus den unterschiedlichen zu überwindenden Energiebarrieren während des Reaktionsverlaufs (siehe Abbildung 1.4). Es resultiert daraus ein Unterschied für die durch diese Enzyme katalysierte Acyltransferreaktion von Z-YGGF-OCH<sub>2</sub>CN und L-NH<sub>2</sub> zu Z-YGGFL-NH. Während diese Reaktion mit Chymotrypsin in einer maximalen Produktausbeute von 56 % endet und die anschließend stattfindende Sekundärhydrolyse an der Chymotrypsin sensitiven -Y-G- Schnittstelle zu

einem Produktabbau führt, verläuft diese Reaktion mit Methylchymotrypsin mit 99 % Produktausbeute vollständig und unterliegt keiner sekundären Produkthydrolyse [127, 128]. Die Schlussfolgerungen aus diesem Beispiel lassen vermuten, dass ein Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten für die jeweils ablaufende Reaktion bei den Thioesterasen bzw. bei den Serinproteasen besteht, welcher ebenfalls zu unterschiedlichen Acyltransferseigenschaften führt.

Ein Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten zwischen Aminolyse und Hydrolyse kann, bedingt durch den Zustand höchster Aktivierungsenergie, nur im tetrahedralen Übergangszustand vermutet werden. Da die Stabilisierung dieses Übergangszustandes im Falle der Thioesterase bzw. der Serinproteasen im Wesentlichen nur durch das Oxyanion-Loch beeinflusst wird [124, 129], scheint der Unterschied zwischen beiden Proteinen in diesem Bereich zu liegen. Ein Vergleich der aktiven Zentren von Surfactinthioesterase und anionischem Rattentrypsin II, bei welchen die katalytischen Triaden zur Deckung gebracht wurden (vgl. Abbildung 1.5), zeigt, dass das Prolin 26 der Thioesterase und das Glycin 193 des Trypsin räumlich annähernd identisch sind. So stellt sich die Frage, ob die Substitution des Glycin 193 zu Prolin im Trypsin zu ähnlich guten Acyltransferseigenschaften führt, wie sie bei der Thioesterase zu finden sind.

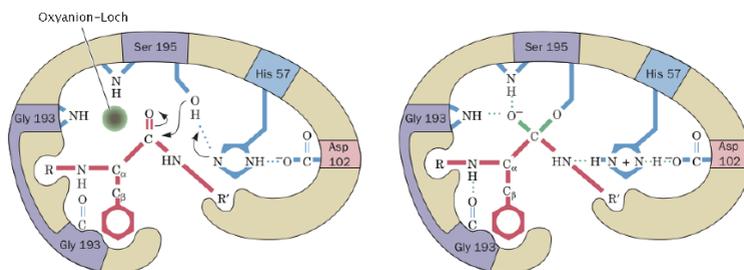


**Abbildung 1.5** Das aktive Zentrum der Surfactinthioesterase (gelb, pdb: 1JMK) und das aktive Zentrum des anionischen Rattentrypsins II (grau, pdb: 1SLU) wurden übereinandergelegt. Die katalytischen Triaden (Serin, Histidin und Aspartat) wurden zur Deckung gebracht. In der Folge überlagern sich die Oxyanion-Löcher der beiden Enzyme; Glutamat 192, Glycin 193 und Aspartat 194 des Trypsins mit dem Prolin 25 und Prolin 26 der Surfactinthioesterase.

Einen ersten Hinweis auf diese These lieferte die Arbeit von TSENG [121]. Diese untersucht die Rolle des Prolin im Oxyanion-Loch der Thioesterase. Dabei wurde festgestellt, dass das Prolin 26 der Surfactinthioesterase einen wesentlichen Einfluss auf die Zyklisierungsreaktion und somit auf die Acyltransferreaktion der Thioesterase besitzt. Ein Verlust dieses Prolins geht mit dem Verlust der Zyklisierungsreaktion zugunsten der Hydrolysereaktion einher.

Im Gegensatz dazu führt die Substitution des hoch-konservierten Glycin 193 bei Serinproteasen zu einer drastisch reduzierten Hydrolyse-Aktivität [130], wobei die Acyltransferseigenschaften in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

**Mechanismus der Serinproteasen unter besonderer Berücksichtigung des Oxyanion-Lochs** Mit der erfolgreichen Ausbildung des MICHAELIS-MENTEN-Komplexes, auf dessen Bildung hier nicht weiter eingegangen werden soll, erfolgt die Desolvatation des an der katalytischen Triade beteiligten Histidins und des Serins. Diese geht mit einer Verkürzung des Asparat-Histidin-Abstandes der katalytischen Triade einher. In diesem Zusammenhang werden zwei Mechanismen der Deprotonierung des Histidins diskutiert, zum einen die *low barrier hydrogen bond*<sup>15</sup> [131, 132] und zum anderen die rein elektrostatische Komplettation des Protons [123, 133]. Durch die Abstraktion des Protons am Imidazolring des Histidins wird der  $pK_S$ -Wert um bis zu fünf Größenordnungen erhöht. Dies hat zur Folge, dass in einer konzertierten Reaktion<sup>16</sup> das Proton vom Serin 195 abstrahiert wird und ein Seryl-Alkoholat-Anion entsteht, welches den Carbonylkohlenstoff der sich in der  $P_1$ -Position befindlichen Aminosäure angreift. Aus dem MICHAELIS-MENTEN-Komplex entsteht der



**Abbildung 1.6** Schematische Darstellung der Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes in Serinproteasen am Beispiel von Chymotrypsin; mit Aspartat 102 (Asp 102), Histidin 57 (His 57) und Serin 195 (Ser 195) als katalytische Triade und Glycin 193 (Gly 193), welche das Oxyanion-Loch bilden (linkes Bild) und den tetrahedralen Übergangszustand (rechtes Bild) mit Hilfe der Amidprotonen des Peptidrückrats stabilisieren [129]. Abbildung entnommen aus [134].

tetrahedrale Intermediatzustand. Die Bildung des Oxyanion stellt, aufgrund der stark negativen Ladung während der Katalyse, den Zustand der höchsten Energie dar und damit den für die Reaktionsgeschwindigkeiten entscheidenden Schritt [135]. Dieser Zustand wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert [136], wodurch im Verhältnis zur unkatalysierten Reaktion eine Absenkung der zu überwinden Energiebarriere erfolgt [137]. Trotz der Stabilisierung ist dieser Zustand sehr energiereich und setzt sich mit hoher Geschwindigkeit in das Acylenzymintermediat, unter Abspaltung der Abgangsgruppe, um. Hierbei wird ein Proton vom an der Katalyse beteiligten Histidin auf die Abgangsgruppe übertragen [138]. Bei diesem Intermediat liegt der Carbonylkohlenstoff als Oxoester, kovalent an die Seitenkette des Serin 195 gebunden, vor. Das so acylierte Serin 195 wird anschließend wieder durch den nukleophilen Angriff eines Wassers oder, wie im Falle der reversen Proteolyse, durch ein Amin deacyliert. Dieser Teil der Reaktion kann als Umkehr der Acylierungsreaktion

<sup>15</sup>Die *low barrier hydrogen bond* beschreibt eine kurze, starke Wasserstoffbrückenbindung, deren Betrag zur Bindungsstabilisierung mit 12-24 kJ/mol wesentlich höher ist, als der einer gewöhnlichen Wasserstoffbrückenbindung mit 2,4-12 kJ/mol.

<sup>16</sup>Eine konzertierte Reaktion beschreibt eine Reaktion bei der Bindungsbrüche und -neuknüpfungen in einem Schritt stattfinden. Es muss nur eine Energiebarriere überwunden werden und es existiert nur ein Übergangszustand.

angesehen werden, so dass auch bei dieser Reaktion ebenfalls ein Oxyanion entsteht und ebenfalls ein tetrahedraler Intermediatzustand durchlaufen werden muss [124, 129, 137]. Auch hier spielt die Stabilisierung dieses Zustandes wiederum eine entscheidende Rolle. Eine Wasserstoffbrücke zur Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes bildet in den Serinproteasen das  $N^{\alpha}$ -Proton des Glycin 193 [136] (vgl. Abbildung 1.6). Dieses ist allerdings in der Thioesterase, aufgrund der Iminostruktur des Prolin 26, nicht vorhanden. Wird allerdings, wie oben beschrieben, das Prolin 26 durch ein Glycin substituiert, verhält es sich wie eine Esterase und nicht mehr, wie in seiner natürlichen Funktion vorgesehen, als Transferase [121].

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Einführung von Proline in das Oxyanion-Loch eines Trypsin zur Folge haben könnten, dass man ein Trypsin erhält, welches hydrolytisch weniger aktiv ist im Vergleich zum *wt*-Trypsin, aber gute Acyltransfereneigenschaften aufweist. Um diese These zu beweisen, sollten in das anionische Rattentrypsin II, welches sich schon mehrfach für die Studien von Veränderungen als nützlich erwiesen hat [85, 86, 139], Proline in das Oxyanion-Loch eingeführt werden. Aus dem Vergleich der Oxyanion-Löcher resultieren dabei sechs Varianten des Trypsins.

Zu erstellende Trypsinvarianten:

- Q192P, G193P und D194P als Einfachvarianten
- Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P als Doppelvarianten

Es wurde beachtet, dass in der Surfactinthioesterase zwei Proline das Oxyanion-Loch (Prolin 25 und Prolin 26) umgeben, dementsprechend sollten in dieser Arbeit auch die Doppelmutanten erstellt werden. Da das Oxyanion-Loch des Trypsin aus vier Resten gebildet wird, Glutamat 192, Glycin 193, Aspartat 194 und Serin 195, sollten bis auf das Serin 195, alle Reste durch Prolin substituiert werden. Das Serin 195 wurde nicht mutiert, da es einen essentiellen Bestandteil der katalytischen Triade darstellt. Auf eine Dreifachmutante sollte an dieser Stelle verzichtet werden, da dies nicht dem natürlichen Vorbild der Thioesterase entspricht und Proline als Strukturbildner in dreifacher Ausführung unvorteilhaft erscheinen.



## 2 Zielstellung

Aus dem mechanistischen Vergleich der Surfactinthioesterasedömane der nichtribosomalen Peptidsynthetase mit dem anionischen Rattentrypsin II ging hervor, dass es strukturelle Unterschiede im Bereich des Oxyanion-Loches gibt. Studien haben belegt, dass das Oxyanion-Loch der Thioesterase durch ein Doppelprolinmotiv gebildet wird. Die für die Stabilisierung des tetrahedralen Intermediates notwendige Wasserstoffbrückenbindung wird aufgrund des Iminocharakters des Prolins nicht bereitgestellt. Wird dabei eines der Proline gegen ein Glycin substituiert, kommt es zu einer dramatischen Verschiebung des Zyklisierungs- zu Hydrolyseverhältnisses, zu Ungunsten der Zyklisierungsreaktion. Das dabei entstehende Oxyanion-Loch gleicht dem der Serinproteasen. Wird hingegen das Glycin des Oxyanion-Loches in Serinproteasen gegen ein Prolin ausgetauscht, führt dies zu stark erniedrigten Hydrolyseraten. Die Vermutung, welche sich aufdrängt, besteht darin, dass diese Serinproteasen, analog zu den Thioesterasen, sehr gute Acyltransfereigenschaften aufweisen. Die Überprüfung dieser These war Ziel dieser Arbeit.

Zu diesem Zweck sollten die entsprechenden Prolin-Mutanten des anionischen Rattentrypsin II erstellt werden. Aus dem Vergleich der Oxyanion-Löcher der Surfactinthioesterase und des Rattentrypsins II wurden drei Einfachvarianten und drei Doppelvarianten abgeleitet.

- Q192P, G193P und D194P als Einfachvarianten
- Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P als Doppelvarianten

Diese galt es herzustellen und auf ihre Acyltransfereigenschaften hin zu untersuchen, um einen möglichen Nutzen für reverse Proteolyse-Reaktionen zu ermitteln.

## **Teil II: Theoretischer Teil**



## 3 Theoretischer Teil

Dieser Teil der Arbeit soll einen Einblick in die Hintergründe der durchgeführten Arbeiten geben und die daraus folgenden Arbeitsabläufe verdeutlichen. Im Gegensatz zum Abschnitt Material und Methoden (siehe 5) werden an dieser Stelle allerdings nicht die Abläufe und Bedingungen der einzelnen Experimente erläutert.

Da sowohl die einzuführende Aminosäure Prolin, als auch das Oxyanion-Loch als problematisch für die strukturelle Integrität und die enzymatische Funktion des Trypsins erscheinen, und ein Gelingen der Überexpression der einzelnen Proteine bis hin zur enzymatischen Charakterisierung stark von diesen Eigenschaften abhängig ist, sollte die praktische Arbeit zweckmäßig in drei Abschnitte unterteilt werden.

Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der Generierung der Varianten auf DNA-Ebene, der Expression und der Reinigung sowie mit der Bestimmung der aktiven Enzymspezies. Abschnitt zwei widmet sich im Wesentlichen ausgewählten strukturellen Eigenschaften der Trypsinvarianten und der dritte Abschnitt stellt die eigentlichen enzymatischen Untersuchungen bis hin zur Anwendbarkeit der Trypsinvarianten für die reverse Proteolyse dar (vgl. Übersicht in Abbildung 3.1).

### 3.1 Überexpression und Reinigung der Varianten

#### 3.1.1 Generierung der Trypsinvarianten auf DNA-Ebene

Die Bereitstellung der Varianten erfolgte mit dem bereits etablierten pST-pYT-Vektor-System (eine schematische Darstellung der Vektoren befindet sich im Anhang in Abbildung C.4) und anschließender Überexprimierung in Hefezellen [85]. Die Generierung der Trypsinvarianten erfolgte durch gerichtete Mutation im pST-Vektor und das erhaltene Gen wurde nach Selektion und erfolgreicher Sequenzierung in den pYT-Expressionsvektor umkloniert. Da beide Vektoren für das System der *E. coli*-Zellen eine Ampicillin-Resistenz aufweisen, erfolgte eine zusätzliche Umklonierung in den pET28a-Vektor. Durch diesen Schritt wird eine Selektionskaskade erzeugt, welche von einer Ampicillin- zu einer Kanamycin- und wieder zurück zu einer Ampicillinresistenz führt. In der Folge kommt es zu einer Reduktion der Anzahl von falsch-positiven Klonen.

#### 3.1.2 Überexpression und Reinigung

Die Expression selbst erfolgte im Hefezellstamm *Saccharomyces cerevisiae* DLM 101 $\alpha$ . Im Hefesystem bietet die Expression mit Hilfe des pYT-Vektors mehrere Vorteile. So kann die Expression mit Hilfe von Glucose induziert werden nachdem eine entsprechend hohe Zelldichte erreicht wurde, womit eine Inhibition des Zellwachstum durch die Toxizität

<sup>1</sup>Die  $\alpha$ -Faktor-Sequenz ist ein Signalpeptid zur Bestimmung des Transportweges von Proteinen innerhalb der Zelle [140].

der Produkte weitgehend verhindert werden kann. Darüber hinaus führt die enthaltene  $\alpha$ -Faktor-Sequenz<sup>1</sup> zu einer Sezernierung des Produktes ins Medium [85], was wiederum einem Selbstverdau der Zellen durch die Trypsine entgegenwirkt und eine vereinfachte Reinigung aufgrund der geringen Anzahl durch Hefe ins Medium sezernierter Proteine ermöglicht. Zudem bietet die Verwendung von Hefezellen als eukaryotisches Expressionssystem Vorteile für die korrekte Disulfidverknüpfung von eukaryotischen Zielproteinen aufgrund des vorhandenen GSH-GSSG-Systems<sup>2</sup>. Zusätzlich ist mit diesem Expressionssystem ein vereinfachtes *Up-Scaling* möglich<sup>3</sup> (eine Übersicht ist in [142] zu finden).

Die Reinigung der Trypsinvarianten erfolgte nach einem mehrstufigen Protokoll. Nach Abtrennung der Zellen und anderer unlöslicher Schwebstoffe durch Zentrifugation fand eine Anreicherung der Trypsinogenvarianten an einem Kationentauscher statt. Das erhaltene Trypsinogen wurde mit Hilfe von Enterokinase<sup>4</sup>, dem natürlichen Aktivierungsprozess entsprechend [143, 144], aktiviert und einer Abtrennung nicht aktivierter Spezies an einem Anionentauscher unterzogen.

Die zuvor genannten Reinigungs- und Anreicherungsschritte basieren auf kompetitiven Prinzipien. Diese Eigenschaften führen dazu, dass nicht nur das entsprechende Trypsin angereichert wird, sondern auch Proteine und Substanzen mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften. Ebenso kann dies dazu führen, dass inaktive Trypsinspezies akkumuliert werden. Um diesem Umstand entgegenzuwirken, bot sich an dieser Stelle ein Reinigungsschritt mit einer Affinitätschromatographie<sup>5</sup> an.

Für die Reinigung von Trypsin haben sich vor allem die Reinigung mit immobilisiertem Benzamidin [148] als auch mit immobilisiertem Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI) [86] etabliert. Der Vorteil dieser beiden Chromatographien liegt in der unterdrückten Autolyse<sup>6</sup> und der Affinität zu Trypsin. Hier ergeben sich jedoch für beide Methoden Unterschiede: Während bei der Reinigung mit Hilfe des SBTI nahezu alle Substratbindetaschen des Trypsins besetzt werden [149, 150], ist für die Bindung des Benzamidins nur die S<sub>1</sub>-Bindetasche notwendig [151]. Aus dieser Tatsache ergibt sich, dass die Reinigung mit Benzamidin weniger affin erfolgt als mit SBTI. Dabei ist jedoch zu beachten, dass es aufgrund der räumlichen Nähe des zu modifizierenden Oxyanion-Lochs mit den spezifitäts- und selektivitätsdeterminierenden Bereichen des Trypsins zu Veränderung in der Substratspezifität kommen kann [124, 152, 153]. Des Weiteren geht mit einem veränderten Oxyanion-Loch häufig eine Veränderung in der Affinität zu Inhibitoren einher [154, 155], wodurch die Reinigung der einzelnen Varianten mit der Benzamidin-abhängigen Affinitätschromatographie besser gelingen kann als mit der für Trypsin spezifischeren SBTI-abhängigen Affinitätschromatographie. Dieser Aspekt sollte innerhalb dieser Arbeit näher untersucht werden. Zu beachten ist hierbei, dass nicht aktiviertes Trypsinogen durch die Affinitätschromatographie nicht mehr abgetrennt werden kann [156, 157] und somit

<sup>2</sup>Glutathion (GSH) bzw. das Disulfid (GSSG) ist ein Isopeptid bestehend aus drei bzw. sechs Aminosäuren, das im Cytoplasma von sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten vorkommt, und an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt ist [141].

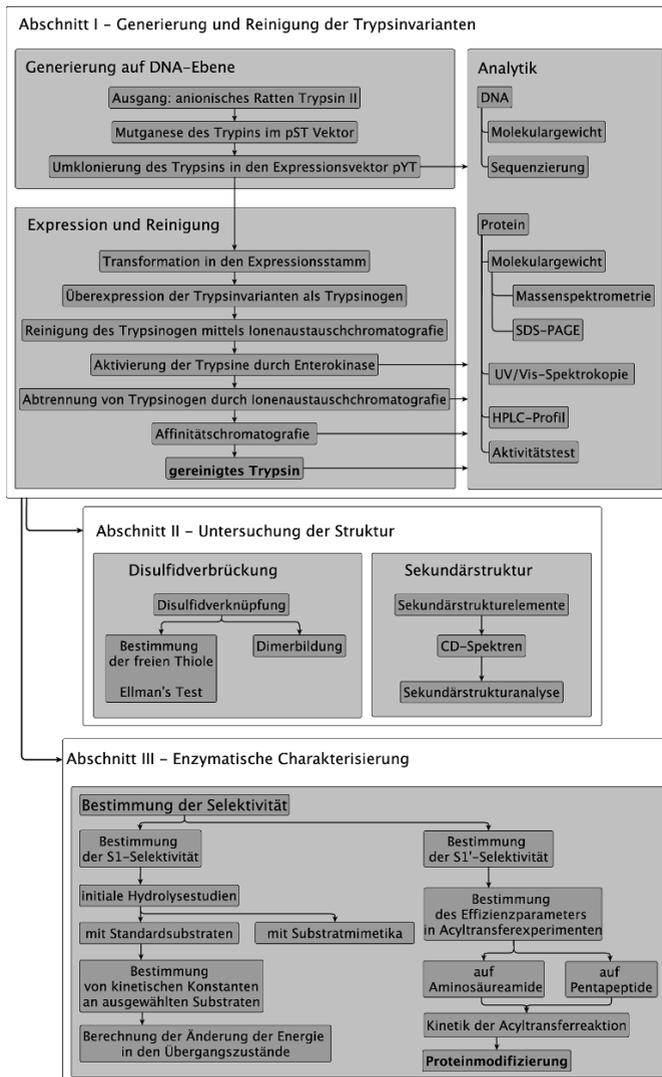
<sup>3</sup>*Up-scaling* oder *scale-up* ist ein in der Verfahrenstechnik gebräuchlicher Begriff für die Vergrößerung des Maßstabes für ein Herstellungsverfahren.

<sup>4</sup>Enterokinase oder Enteropeptidase ist ein Enzym, welches im Bürstensaum der Duodenumschleimhaut gebildet wird und unter Spaltung der Sequenz VDDDDK das Trypsinogen in das aktive Trypsin überführt [143, 144].

<sup>5</sup>Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die spezifische Wechselwirkung eines Proteins mit einem immobilisierten Liganden genutzt wird [145–147].

<sup>6</sup>Autolyse beschreibt hier den Selbstverdau von Trypsin.

eine Abreicherung von Trypsinogen schon bei der Reinigung mit dem Anionentauscher möglichst vollständig erfolgen sollte.



**Abbildung 3.1** Übersicht der durchzuführenden Arbeitsschritte innerhalb dieser Arbeit von der Erzeugung der Trypsinvarianten mit der entsprechenden Analytik, der Untersuchung der Struktur der resultierenden Proteine bis hin zur enzymatischen Charakterisierung und der Überprüfung der Anwendbarkeit für die Proteinmodifizierung.

### 3.1.3 Analytik

An dieser Stelle soll auf die begleitende Analytik zur Darstellung der Trypsinvarianten eingegangen werden, während die Abschnitte 3.2 und 3.3 selbst analytische Untersuchungen der einzelnen Trypsinvarianten darstellen.

Die Analytik der Trypsinvarianten stellt eine besondere Herausforderung dar, da sich die einzelnen Varianten nur in ein bis zwei Aminosäuren vom *wt*-Trypsin unterscheiden, diese aber dennoch beträchtlichen Einfluss sowohl auf die Struktur als auch auf die Aktivität haben könnten. Die Kombination verschiedener analytischer Methoden bildet die Grundlage für eine Aussage über eine korrekt erhaltene Trypsinvariante. Besondere Aufmerksamkeit wurden jenen Methoden geschenkt, welche eine möglichst genaue Aussage zu der Sequenzen und der Enzymaktivität haben.

#### DNA-Ebene

Zur Analyse der korrekten Konstrukte kamen zum einen Standardmethoden zur Bestimmung des Molekulargewichts [158] zum Einsatz und zum anderen wurden die erzeugten Mutanten sequenziert [159].

#### Protein-Ebene

Auf Protein-Ebene hat die Analytik zwei Ziele: zum einen den Nachweis der Reinheit und Quantität des Proteins, zum anderen den Nachweis der korrekten Enzymspezies. Die Methoden, die hierbei zum Einsatz kamen, überschneiden sich zum Teil in der Erfüllung dieser Ziele. Während die Bestimmung des Molekulargewichts mittels SDS-PAGE für die Determinierung des Trypsins und dessen Reinheit ausreicht [160, 161], kann nur die Bestimmung des exakten Molekulargewichts in Zusammenhang mit der korrekten DNA-Sequenzierung Auskunft über die erhaltene Proteinsequenz geben. In diesem Fall dient die SDS-PAGE, die UV/Vis-Spektroskopie und das HPLC-Profil im Wesentlichen der Untersuchung der Reinheit der Trypsinvarianten, während die exaktere Methode der Massenspektrometrie, in Zusammenhang mit der DNA-Sequenzierung, Auskunft über die richtige Proteinsequenz gibt [162]. Durch die UV/Vis-Spektroskopie können Aussagen über die Reinheit und zur Proteinmenge getroffen werden. Im Gegensatz dazu bilden Aktivitätstests eine Möglichkeit Aussagen sowohl über die Reinheit und Quantität der Trypsinvarianten zu treffen als auch über deren Funktionalität. Sie bilden eine erste Grundlage für die enzymatische Charakterisierung.

#### Aktivitätstest

Die Bestimmung der Aktivität erfolgt unter Zuhilfenahme des Standardsubstrates für Trypsin *N*-*a*-Benzoyl-*D*/*L*-arginyl-4-nitroanilid (Bz-*D*/*L*-R-pNA). Um den realen Umsatz von Substrat pro Zeit und Enzymmenge zu ermitteln, war es zunächst notwendig den Anteil an tatsächlich aktiver Enzymspezies zu bestimmen. Diese Notwendigkeit ist dadurch begründet, dass eine Bestimmung der kinetischen Konstanten nur möglich ist, wenn der tatsächliche Anteil an aktiver Enzymvariante bekannt ist (siehe Abschnitt 3.3.2).

Für die Bestimmung der aktiven Spezies von kinetisch kontrollierten Proteasen sind vor allem zwei Methoden gebräuchlich: zum einen die klassische Titration mit einem Inhibitor [163] und der daraus resultierenden Korrelation zwischen eingesetzter Konzentration an

Inhibitor und der Abnahme der Aktivität gegenüber einem Substrat und zum anderen die *burst-phase*-Titration [164, 165]. Beide Methoden weisen spezifische Vor- und Nachteile auf, die im Folgenden näher erläutert und auf ihre Anwendbarkeit für die erzeugten Trypsinvarianten überprüft werden sollen.

**Titration mit einem Inhibitor** Die Möglichkeit, aus der Titration des Enzyms mit einem Inhibitor die Konzentration des Enzyms zu bestimmen, liegt in der Annahme begründet, dass der Inhibitor in einem stöchiometrischen Verhältnis mit dem Enzym wechselwirkt. Um diese Bedingung zu erfüllen, muss der Inhibitor entweder ein kompetitiver Inhibitor mit einem pseudo-irreversibel bindenden Charakter, wie der Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI), oder ein irreversibler Inhibitor sein, wie z. B.  $N^{\alpha}$ -Tosyl-*L*-lysylchloromethylketon (TLCK).

Die pseudo-irreversible Hemmung<sup>7</sup> beruht auf einer starken Wechselwirkung des Inhibitors mit den Substratbindetaschen des Enzyms. Dies setzt voraus, dass die spezifitätsdeterminierenden Bereiche des Enzyms und die Struktur des Inhibitor nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip<sup>8</sup> zu einander passen [150, 168]. Für diese Form der Inhibition ist nicht auszuschließen, dass eine Veränderung im Oxyanion-Loch eine veränderte Selektivität<sup>9</sup> und damit eine veränderte Affinität zu dem Inhibitor zur Folge haben [130, 169]. Sie ist somit für die Titration der in dieser Arbeit zu erzeugenden Trypsinvarianten nicht geeignet [170].

Wesentlich weniger selektiv gestaltet sich die Erkennung der meisten gebräuchlichen, mechanistischen Inhibitoren. Diese tragen in der Regel nur wenige Selektionsmerkmale, sind aber in der Lage aufgrund ihres Wirkmechanismus die entsprechende Protease kovalent und irreversibel zu modifizieren und damit effektiv zu inhibieren. Zudem kann man aus ihrer Wirkungsweise Rückschlüsse auf die Funktionalität der Protease ziehen. Diese Eigenschaft scheint bei der Studie von im Mechanismus veränderten Trypsinen, wie es in dieser Arbeit der Fall ist, besonders vorteilhaft zu sein. Die Wahl des Inhibitors fiel auf TLCK. Dieser Inhibitor ist bei pH-Werten unter 8 nicht von Spontanhydrolyse<sup>10</sup> betroffen und Dank seiner wenigen Selektionsmerkmale kann dieser Inhibitor mit einer Reihe von Trypsinen interagieren [172–174].

Der Mechanismus der Inhibition folgt dabei dem Verlauf einer  $S_N2'$ -Reaktion. Zunächst wird die Ketofunktion des Substrates durch das Serin 195, unter Ausbildung einer Esterbindung, angegriffen, infolgedessen kommt es zur Abspaltung eines Chloridions und zum simultanen nukleophilen Angriff des Histin 57. Das Histidin 57 wird alkyliert und die Bindung zum Serin 195 wird hydrolysiert. Während dieser Reaktion durchläuft das TLCK einen tetrahedralen Übergangszustand [173, 175, 176]. Eine erfolgreiche Umsetzung der Trypsinvarianten mit TLCK und die damit verbundene Inhibition beweisen, dass

<sup>7</sup>Die pseudo-irreversible Hemmung beschreibt die kompetitive Inhibition eines Enzyms durch einen Inhibitor, welcher aufgrund seiner hohen Affinität nicht mehr vom Enzym abgelöst werden kann.

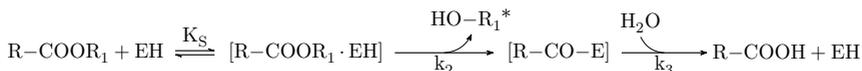
<sup>8</sup>Das Schlüssel-Schloss-Prinzip besagt, dass das Substrat, oder wie in diesem Fall der Inhibitor, mit dem Enzym über schwache, nicht kovalente Wechselwirkungen einen relativ stabilen Übergangszustand ausbildet [166, 167].

<sup>9</sup>Die Selektivität der Enzyme ist eng verknüpft mit der selektiven, molekularen Erkennung der Substrate durch die chirale, aktive Tasche. [80].

<sup>10</sup>Spontanhydrolyse beschreibt die Basen-katalysierte Zersetzung einer Substanz mit Wasser als Lösungsmittel [171].

sowohl das Oxyanion-Loch, als auch die katalytische Triade innerhalb der Trypsinvarianten funktional sind.

**burst-phase-Methode** Im Gegensatz zur Titration mit einem Inhibitor ist für die *burst-phase*-Methode zur Bestimmung der aktiven Spezies kein Inhibitor notwendig. Es ist eine schnelle und einfach durchzuführende Methode, die wenig Substrat und Enzym benötigt. Sie nutzt den schnellen Umsatz eines Substrates zum Acylenzymintermediat unter Freisetzung einer chromogenen Gruppe aus (siehe Reaktionsschema 3.1) [124, 156]. Der in der initialen Acylierungsreaktion freigesetzte Anteil an Chromophor lässt sich direkt über das LAMBERT-BEERSCHE-Gesetz<sup>11</sup> mit dem Anteil an aktiver Enzymspezies korrelieren [164, 165]. Bedingung ist, dass die Substratkonzentration zu Beginn der Reaktion mindestens 10 mal größer ist als der  $K_m$ -Wert<sup>12</sup> und die Acylierungsreaktion viel schneller erfolgt als die Deacylierung ( $k_2 \gg k_3$ ) [163]. Für Trypsin hat sich bei dieser Methode das Substrat *N*- $\alpha$ -Benzoyl-*D/L*-arginyl-4-nitroanilid als besonders nützlich erwiesen [165]. Es erfüllt alle zuvor genannten Bedingungen für das *wt*-Trypsin und sollte auf seine Anwendbarkeit für die Trypsinvarianten untersucht werden.



**Reaktionsschema 3.1** Mechanistisches Modell der kinetisch kontrollierten Hydrolyse durch Serinproteasen: EH - freies Enzym, R-COOR<sub>1</sub> - Acyldonor in Form eines Esters mit R<sub>1</sub> als chromogene Abgangsgruppe, R-COOR<sub>1</sub> · EH - MICHAELIS-MENTEN-Komplex, R-CO-E - Acylenzymintermediat, R-COOH - Hydrolyseprodukt in Form der freien Carbonsäure.

## 3.2 Untersuchung zur Struktur der Trypsinvarianten

Die Untersuchung der Struktur stellt nur einen kleinen Teil der Analysen innerhalb dieser Arbeit dar, da der wesentlich interessantere Teil die Beantwortung der Frage nach Veränderungen in den Acyltransfereigenschaften darstellt. Dennoch bildet der Zusammenhang aus Funktion und Struktur einen entscheidenden Aspekt für die Aktivität der zu untersuchenden Trypsinvarianten.

Für das anionische Rattentrypsin II konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung der Disulfidbrücke Cystein 191-Cystein 220 durch Austausch der Cysteine mit Alanin oder Serin zum einen keinen Einfluss auf die Stabilität des Trypsins hat und zum anderen sowohl eine Veränderung innerhalb der Substratspezifität als auch eine 20-200fach verringerte Aktivität bei der Hydrolyse von Amidsubstraten hervorruft [139]. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich für die ausgewählten Trypsinvarianten einige interessante Aspekte:

<sup>11</sup>Das LAMBERT-BEERSCHE-Gesetz beschreibt die Schwächung der Strahlungsintensität beim Durchgang durch einen absorbierenden Stoff in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Konzentration der absorbierenden Substanz [177].

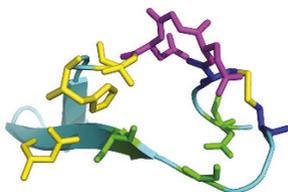
<sup>12</sup> $K_m$  gibt die Substratkonzentration an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist. Sie ergibt sich als  $K_m = \frac{k_1 + k_2}{k_{-1}}$  mit  $K_S = \frac{k_1}{k_{-1}}$  bei  $v = \frac{v_{max}}{2}$ .

1. Das Oxyanion-Loch, mit den Aminosäureresten Glutamin 192, Glycin 193 und Aspartat 194, und das Serin 195 befinden sich auf einer Schleife, welche durch die Disulfidbrücke Cystein 191-Cystein 220 begrenzt wird [178].
2. Das Oxyanion-Loch befindet sich direkt zwischen dem Serin 195 und dem Cystein 191.
3. Das Oxyanion-Loch formt einen gewölbten Bereich, der die Peptidbindungen des Glycin 193 in eine *cis*-Konformation zwingt [129].
4. Die Aminosäure Aspartat 189 sitzt auf dem Boden der S<sub>1</sub>-Bindetasche und ist wesentlicher Bestandteil der Erkennung eines Arginins in P<sub>1</sub>-Position, ebenso wie das Serin 214 und das Glycin 216, welche jeweils an der Ausbildung der S<sub>2</sub>- und S<sub>3</sub>-Bindetaschen beteiligt sind [152, 179].

Aus diesen Beobachtungen lassen sich für die zu erzeugenden Prolinvarianten einige Thesen bezüglich der Struktur formulieren. So ist anzunehmen, dass eine Konformation des Oxyanion-Lochs, welche nicht der natürlichen Konformation entspricht, Auswirkungen auf die katalytische Triade bzw. das durch sie gebildete *Charge-Relay-System*<sup>13</sup>, über den Abstand vom Serin 195 zum Histidin 57, hat. Dies kann zu einer Veränderung bzw. zu einer Inaktivierung führen und damit zu Enzymvarianten, welche auffällig im Aktivitätstest sind (vgl. Abbildung 3.2). Alternativ wäre eine Änderung der Orientierung des Cystein 191 zu betrachten, welche bewirken könnte, dass sowohl bei der Disulfidbrücke Cystein 191-Cystein 220 als auch an den Substrat-bindenden Bereichen mit Aspartat 189, Serin 214 und Glycin 216 Veränderungen auftreten. Die Folgen, welche hieraus entstehen könnten, sind eine veränderte Substratselektivität, ein Bruch bzw. eine nicht vorhandene Disulfidbrücke zwischen Cystein 191 und Cystein 220 oder die Veränderung bzw. die Verschiebung der gesamten Schleife. Um diese Fragen zu klären, bieten sich vor allem Untersuchungen an, welche die Funktionalität der katalytischen Triade (siehe 3.1.3), die Disulfidverknüpfung (siehe 3.2.1), die Substratselektivität (siehe 3.3.1) und die Strukturen der Trypsinvarianten in ihrer Gesamtheit (siehe 3.2.2) näher betrachten. Letzteres spielt eine wichtige Rolle wegen der besonderen Stellung des Prolins innerhalb der proteingenen Aminosäuren im Hinblick auf die Freiheitsgrade im RAMACHANDRAN-Diagramm [180] und der damit verbundenen Besonderheiten im Bezug auf die strukturbildenden Eigenschaften des Prolins innerhalb von Proteinen[181].

---

<sup>13</sup>Das *Charge-Relay-System* wird durch die Reste der katalytischen Triade gebildet. Die Seitenkette des Aspartat 102 trägt unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung. Diese bildet zum Stickstoff gebundenen Proton des Imidazol-Rings des Histidin 57 eine Wasserstoffbrückenbindung. Das zweite Stickstoffatom des Imidazol-Rings bildet wiederum eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxygruppe des Serin 195, wodurch es zu einer Ladungstrennung kommt, welche die Hydroxygruppe des Serin 195 in ein Alkoholat überführt und somit ein geeignetes Nukleophil für den Angriff auf das Substrat zur Verfügung stellt.



**Abbildung 3.2** Ausschnitt aus der Struktur von Trypsin mit den Aminosäuren von Aspartat 189 bis zum Cystein 220. In diesem Bereich des Trypsins befindet sich eine große Anzahl von katalytisch und selektivitätsrelevanten Positionen, die durch die Einführung von Prolinen in den Bereich des Oxyanion-Lochs beeinflusst werden können. Beschreibung: blau/gelb - Disulfidbrücke Cystein 191-Cystein 220, gelb - Katalytische Triade mit Serin 195, Histidin 57 und Aspartat 102, magenta - das Oxyanion-Loch mit Glutamat 192, Glycin 193 und Aspartat 194, grün - Selektivitätsdeterminierende Aminosäuren mit Aspartat 189, Serin 214 und Glycin 216, cyan - weitere Aminosäuren. pdb: 3FP6 [139]

### 3.2.1 Disulfidverbrückung

Wie zu Beginn dieses Abschnitts erläutert, stellt die Disulfidbrücke Cystein 191-Cystein 220 einen Indikator für strukturelle Veränderungen innerhalb der zu erzeugenden Trypsinvarianten dar. Für deren Untersuchung sind zwei Aspekte von Bedeutung. Zum einen ob freie und zum anderen ob falsch-verbrückte Cysteine vorhanden sind [182]. Die nicht korrekte Ausbildung dieser Disulfidbrücke kann in zwei Szenarien enden. Es könnte sich eine falsche Verknüpfung der Thiole zu Disulfidbrücken ergeben, was mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Inaktivierung der Variante aufgrund einer Verzerrungsbereit der der katalytischen Triade[183] endet. Alternativ könnten sich freie Thiole bilden. Während freie Cysteine eindeutig über den ELLMAN'S-Test nachgewiesen werden können, erweist sich der Nachweis falsch-verbrückter Cysteine als schwierig. Dieser gestaltet sich insofern als problematisch, da dass anionische Rattentrypsin II sechs Disulfidbrücken in seiner Struktur aufweist [183] und somit theoretisch eine Vielzahl von neuen Kombinationen möglich ist. Praktisch hat sich jedoch gezeigt, dass das anionische Rattentrypsin II eine stabile Struktur [184] hat. Eine Veränderung einzelner Cysteine durch Punktmutationen bzw. durch chemische Modifizierung hat zu keinem Trypsin geführt, welches für die restlichen Cysteine ein verändertes Disulfidmuster aufweist. Enzymatische Aktivität und Struktur blieben erhalten [185]. Es ist aber bekannt, dass bei entsprechend exponierten Cysteinen [139, 186], wie sie durch die Reste Cystein 191 und Cystein 220 dargestellt werden, die Bildung von Trypsin-Dimeren möglich ist.

#### Ellman's-Test

Der ELLMAN'S-Test dient dem einfachen Nachweis freier Thiole in Geweben und Proteinen [187, 188]. Dieser Test beruht auf der spezifischen Reaktion von ELLMAN'S-Reagenz (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) - DTNB) mit Thioalkoholen, hierbei wird die Disulfidbrücke des ELLMAN'S-Reagenz nukleophil durch den Thioalkohol angegriffen und es entsteht das gemischte Disulfid unter Freisetzung des 2-Nitro-5-thiobenzoates. Die Detektion des 2-Nitro-5-thiobenzoates kann spektroskopisch bei 412 nm erfolgen und stellt eine sensitive Methode des Thiol-Nachweises dar [189, 190]. Dieser Test erfolgt im neutralen bzw. basisch wässrigen Millieu und kann unter Hochsalzbedingungen durchgeführt werden. Dies ist

notwendig für die Denaturierung des zu untersuchenden Proteins und für die Freilegung der Thiolgruppen, welche nicht oberflächenexponiert sind [139]. Die Umsetzung erfolgt dabei quantitativ und kann über das LAMBERT-BEERSCHE-Gesetz<sup>14</sup> ausgewertet werden. Die Denaturierung der Trypsinvarianten erfolgte unter Hochsalzbedingungen mit 8 M Harnstoff [139]. Als Negativkontrolle diente *wt*-Trypsin, als Positivkontrolle fand Clostripain Anwendung. Clostripain stellt als Cystein-Protease [191] mit einem freien Thiol einen geeigneten Kandidaten für die Umsetzung mit ELLMAN'S-Reagenz dar [192]. Eine weitere Kontrolle erfolgte mit der Trypsinvariante E80C, welche über ein zusätzliches Cystein verfügt, welches nicht frei vorliegt, sondern eine intermolekulare Disulfidbrücke bildet.

### Dimerbildung

Die Bildung von falsch verknüpften Disulfidbrücken kann vor allem bei Cysteinen, die an der Oberfläche von Proteinen exponiert sind, zur Bildung von Dimeren führen [186]. Die Bildung von Dimeren ergibt im ELLMAN'S-Test ein negatives Ergebnis und kann somit nicht detektiert werden. Der Nachweis von Dimeren kann aber unter Verwendung einer nicht-reduzierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgen. In dieser würden etwaige intermolekulare Dimere aufgrund ihres größeren Molekulargewichts ein anderes Elektropherogramm ergeben als die monomeren Proteinspezies.

Die verwendete Methodik wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe etabliert, so dass sowohl geeignete Gelsysteme als auch ein geeigneter Vertreter mit der Trypsinvariante E80C, welcher zur Bildung von Dimeren neigt, zur Verfügung standen [186].

### 3.2.2 Sekundärstruktur

Wie zu Beginn dieses Abschnitts (vgl. 3.2.1) erläutert, ist unter Umständen mit einer Veränderung der Struktur in den Trypsinvarianten zu rechnen, welche abhängig von der Substitution durch Prolin ist. Die aus den Substitutionen resultierenden, strukturellen Veränderungen lassen sich mit Hilfe strukturaufklärenden Methoden, wie NMR oder Röntgenkristallstrukturanalyse, ermitteln. Eine einfachere und schnellere Methode für einen Überblick über die Struktur, im Besonderen über die Verhältnisse der Sekundärstrukturelemente, bietet die CD-Spektroskopie im Fern-UV-Bereich<sup>15</sup> [194]. Mit deren Hilfe ist es möglich, mit einfachen Messungen eine Aussage über den Sekundärstrukturanteil innerhalb der erzeugten Proteine zu treffen und damit über eventuelle Veränderungen im Vergleich zum *wt*-Trypsin. Die so erhaltenen Daten lassen wiederum Rückschlüsse auf etwaige Strukturveränderung innerhalb des Gesamtproteins der Mutanten zu und ergeben im Zusammenhang mit der Aktivität, der Selektivität und der Disulfidverknüpfung einen Überblick über die durch die eingeführten Proline herbeigeführten Veränderung der Struktur innerhalb der Trypsinvarianten. Die durchgeführten CD-spektroskopischen

<sup>14</sup>Das LAMBERT-BEERSCHE-Gesetz beschreibt die Schwächung der Strahlungsintensität beim Durchgang durch einen absorbierenden Stoff in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Konzentration der absorbierenden Substanz [177].

<sup>15</sup>Fern-UV oder Amidregion, bei 170-250 nm, wird für die Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts von Proteinen genutzt. Im Gegensatz dazu beschreibt der Nah-UV oder Aromatenbereich bei 250-300 nm die Tertiärstruktur von Proteinen, in Abhängigkeit von den Wechselwirkungen der Aromaten[193].

Untersuchungen beruhen auf den Arbeiten von HUANG [195] und orientieren sich an dessen Ergebnissen und Durchführungen.

Um einen besseren Überblick über die strukturellen Verhältnisse in den einzelnen Trypsinvarianten zu erhalten, wurden zudem Berechnungen für den Sekundärstrukturanteil durchgeführt. Hierfür kamen drei Methoden zum Einsatz:

1. die Berechnung der theoretischen Sekundärstrukturanteile aus der Aminosäuresequenz mit dem Programm PSIPRED
2. die Berechnung der Sekundärstrukturanteile mit Hilfe von einfachen Referenzspektren durch das Programm Jasco Secondary Structure Estimation [196]
3. die Berechnung durch den K2D2-Algorithmus mit dem Vergleich zu einer Datenbank aus bekannten Proteinspektren und deren Sekundärstrukturanteilen [197]

Die Berechnung mit PSIPRED [198, 199] diene als theoretische Grundlage, um vorab einschätzen zu können, welchen Einfluss die eingeführten Proline in den Trypsinvarianten haben sollten. Für die aus den CD-Spektren berechneten Sekundärstrukturanteile wurden zwei Berechnungsmethoden angewendet, um die Limitationen der jeweiligen Berechnungsmethoden zu überwinden. Hier wäre als Limitation für Jasco Secondary Structure Estimation die Strukturüberlagerungen zu nennen, welche aus dem Vergleich der aufgenommenen CD-Spektren mit den CD-Spektren von reinen Strukturelementen resultiert [196, 200]. Die Grenzen der zweiten verwendeten Methode mit dem K2D2-Algorithmus liegen in dem hohen Fehleranteil für  $\beta$ -Faltblattstrukturen, welche aus der geringen Signalintensität dieser resultiert [197]. Der Vergleich aus den theoretisch berechneten und den aus CD-Spektren errechneten Sekundärstrukturanteilen sollte abschätzen lassen, welchen Einfluss die eingeführten Proline auf die Gesamtstruktur der Trypsinvarianten haben.

### 3.3 Enzymatische Charakterisierung

Die enzymatische Charakterisierung der Trypsinvarianten umfasst den größten Teil dieser Arbeit. Mit ihrer Hilfe sollten die Fragen nach der Spezifität, der Aktivität sowie der Anwendbarkeit der Trypsinvarianten für die Protease-katalysierte Acyltransferreaktion beantwortet werden.

Wie unter Abschnitt 3.2 ausgeführt, kann es bei den Mutanten zu einer Veränderung der Substratspezifität kommen. Um eine Acyltransferreaktion durchführen zu können, ist es von größter Wichtigkeit, die exakte Selektivität der Trypsinvarianten für die Acyldonor- und Acylakzeptor-Komponenten zu kennen, da nur mit Kenntnis dieser geeignete Acyltransfersysteme gefunden werden können. Eine eventuelle Veränderung der Selektivität sollte im Wesentlichen im S-Bereich der Trypsinvarianten zu finden sein. Die Verifizierung eventueller Veränderungen sollten durch ein Selektivitäts-*Screening*<sup>16</sup> mit Hilfe einer Methylester-Bibliothek vom Typ Bz-Xaa-OMe erfolgen. Parallel zu diesem Test wurde untersucht welchen Einfluss die Art der zu hydrolysierenden Bindung aufweist und ob eine Nutzung von Substratmimetika möglich ist. Mit den so gewonnenen Daten stehen geeignete Acyldonorkomponenten für Acyltransferreaktionen zur Verfügung.

<sup>16</sup>Unter *Screening* versteht man ein systematisches Testverfahren innerhalb eines definierten Prüfbereichs.

Die Acyldonorkomponenten wurden nun auf die Umsetzbarkeit mit Aminosäureamiden als Acylakzeptoren, unter Verwendung der Trypsinvarianten in Acyltransferreaktionen untersucht. Anschließend wurden diese Untersuchungen um ausgewählte Pentapeptide als Acylakzeptoren vom Typ Xaa-AAAG erweitert. Mit den daraus folgenden Erkenntnissen sollte es möglich sein, ein geeignetes Protein in einer Acyltransferreaktion *N*-terminal zu modifizieren.

### 3.3.1 Hydrolysestudien

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, ist eine Veränderung der Selektivität<sup>17</sup> der Trypsinvarianten möglich. Die Untersuchung auf mögliche Veränderungen der Selektivität wurden, wie zu Beginn von Abschnitt 3.3 erwähnt, mit Hilfe einer Bibliothek aus Aminosäureestern vom Typ Bz-Xaa-OMe (siehe Tabelle 4.10), einer Bibliothek von Carbonsäurederivaten, bestehend aus Estern vom Typ Z-K-XMe, Bz-R-OEt und dem Pentapeptid Bz-AARAG-OH (siehe Tabelle 4.12), sowie einer Bibliothek aus Substratmimetika (siehe Tabelle 4.14), durchgeführt. Alle Substrate wurden auf ihre Hydrolysierbarkeit untersucht und anschließend die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten<sup>18</sup> bestimmt. Die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten wurden bei einer definierten Substratkonzentration ermittelt [202]. Die Substratkonzentration soll in einem großen, molarem Überschuss gegenüber der Enzymkonzentration vorliegen, so dass sich die Substratkonzentration während der Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeit praktisch nicht ändert [203]. In den durchgeführten Hydrolysestudien sollte die Umsatzgeschwindigkeit durch die direkte Bestimmung der Produkt-Edukt-Verhältnisse mittels analytischer RP-HPLC unter optimierten Bedingungen zu definierten Zeitpunkten stattfinden. Aus den Produkt-Edukt-Verhältnissen zu definierten Zeitpunkten wurden mittels linearer Regression die entsprechenden Geschwindigkeiten bestimmt und verglichen. Der direkte Vergleich der ermittelten initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für die Bibliothek der Aminosäureester ergibt für die einzelnen Trypsinvarianten die Selektivität für bestimmte Aminosäuren in S<sub>1</sub>-Position, während der Vergleich der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der Substratmimetika die Selektivität für die unterschiedlichen Esterabgangsgruppen zeigt. Die Wahl der Substratmimetika fiel auf Ester, die sich in vorangegangenen Arbeiten als nützlich erwiesen hatten [76, 79, 204–206]. Die Selektivitäten der Abgangsgruppen einzelner Substrate unterscheidet sich erheblich, während die *N*-terminale Schutzgruppe und die Aminosäure keine Unterschiede aufweisen. Dies garantiert bei dem Vergleich der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten eine ausschließliche Abhängigkeit von der selektivitätsvermittelnden Esterabgangsgruppe. Der Vergleich der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der Ester vom Typ Z-K-XMe, Bz-R-OEt sowie dem Pentapeptid Bz-AARAG hingegen zeigt die Selektivität für die unterschiedlichen zu hydrolysierenden Bindungen an. Hierbei ist zwischen der Hydrolyse von Thioester-, Oxoester-, Säureamid- und Peptidbindung zu unterscheiden.

<sup>17</sup>Die Selektivität der Enzyme hängt mit der selektiven, molekularen Erkennung der Substrate durch das aktive Zentrum, in welches nur bestimmte Substrate passen, zusammen [80].

<sup>18</sup>Initiale Hydrolysegeschwindigkeit  $v_0$  ist die Zunahme der Umsatzgeschwindigkeit einer definierten Substratkonzentration bei einer bestimmten Enzymkonzentration gegenüber der unkatalysierten Reaktion. Bei der Angabe der initialen Hydrolysegeschwindigkeit bezieht man den umgesetzten Anteil an Substrat pro Zeit auf die Enzymkonzentration [201].

Diese Untersuchungen dienen im Wesentlichen dazu, die Selektivität der Trypsinvarianten zu determinieren und geeignete Substrate für die Bestimmung der  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte, sowie Acyldonoren für die reverse Proteolyse zu finden.

### 3.3.2 Bestimmung kinetischer Konstanten

Ein weiterer Aspekt, der mit aus den initialen Hydrolysestudien gefundenen geeigneten Substraten untersucht wurde, ist die Veränderung der Affinität<sup>19</sup> zu den Substraten, sowie der maximalen Umsatzgeschwindigkeit bzw. Katalysegeschwindigkeit  $k_{cat}$  und der daraus resultierenden Spezifitätskonstanten, definiert durch  $\frac{k_{cat}}{K_m}$ . Diese lassen sich nach den Gleichungen von MICHAELIS und MENTEN [207] sowie durch deren Erweiterungen nach HALDANE und BRIGGS [208] bestimmen. Die Erhebung der Daten erfolgte analog zu den initialen Hydrolysestudien. Allerdings wurden die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten bei variierenden Substratkonzentrationen bestimmt und gegeneinander aufgetragen. Aus den resultierenden v-S-Charakteristiken lassen sich nach der Gleichung:

$$v = \frac{V_{Max} * [S]}{(K_m + [S])} \quad (3.1)$$

mit

$$k_{cat} = V_{Max} * [E_0]^{-1}$$

die entsprechenden Konstanten ermitteln.

Für die Bestimmung der entsprechenden Parameter des *wt*-Trypsins ist aufgrund der niedrigen  $K_m$ -Werte die Lösung mit Hilfe der integrierten MICHAELIS-MENTEN-Gleichung zu bevorzugen. Diese lassen sich über:

$$[P] = [P_0] + [S_0] - K_m \omega \left\{ \left( \frac{[S_0]}{K_m} \right) * e^{\frac{[S_0] - V_{Max} t}{K_m}} \right\} \quad (3.2)$$

nach GOUDAR bestimmen [209], wobei  $\omega$  der LAMBERT-Funktion entspricht [210]. Dazu wird die Produktzunahme pro Zeit bei Substratkonzentrationen  $[S] > 10 * K_m$  bestimmt [209].

Die kinetischen Konstanten wurden für die Substrate Z-K-SMe, Z-K-OMe, Z-K-NHMe, Bz-K-OMe, Bz-R-OMe und Bz-AARAG bestimmt. Mit den gewonnenen Daten lassen sich Aussagen über eine Veränderung der Spezifität der Trypsinvarianten gegenüber dem *wt*-Trypsin treffen. Ebenso ist es möglich, Rückschlüsse auf Veränderungen innerhalb des Mechanismus der Trypsinvarianten zu treffen. Diese sind zu erwarten, da das Oxyanion-Loch einen essentiellen Teil bei Serinproteasen darstellt [124, 129].

<sup>19</sup>Als Maß für die Affinität wird in der Enzymkinetik die MICHALIS-Konstante verwendet. Diese wird nach HALDEN und BRIGGS durch  $K_m = \frac{k'_1 + k_2}{k_1}$  bestimmt [207, 208].

### 3.3.3 Berechnung der Änderungen der Energie der Übergangszustände

Aus den kinetischen Konstanten lassen sich wiederum aus den Ableitungen der VAN'T HOFFSchen Reaktionsisotherme aus der Definitionsgleichung von GIBBS ( $G = H - TS$ ) [211]:

$$\Delta G = \Delta G^\ominus + RT \ln(K) \quad (3.3)$$

die Änderungen der Energie in den Übergangszuständen berechnen [126, 128, 212]. Mit  $R$  als universelle Gaskonstante,  $T$  der Temperatur,  $K$  als Gleichgewichtskonstante,  $\Delta G^\ominus$  als Freie Standardenthalpie und  $\Delta G$  als Freie Enthalpie. Die Freie Standardenthalpie wird dabei durch die Gleichung:

$$\Delta G^\ominus = -RT \ln(K^\ominus) \quad (3.4)$$

definiert. Setzt man nun Gleichung 3.4 in Gleichung 3.3 ein, erhält man nach Umformen:

$$\Delta G = RT \ln\left(\frac{K}{K^\ominus}\right) \quad (3.5)$$

Als Standardreaktion kann die Umsetzung der Substrate durch *wt*-Trypsin betrachtet werden. Es ergibt sich, dass die Gleichgewichtskonstante  $K$  durch die einzelnen Trypsinvarianten und  $K^\ominus$  durch *wt*-Trypsin definiert wird und somit die freie Enthalpie die Differenz der Trypsinvarianten zum *wt*-Trypsin darstellt.

Je nachdem, welche kinetische Konstante man als Gleichgewichtskonstante betrachtet, ergeben sich drei Gleichungen:

für die Deacylierung:

$$\Delta G_D^\ddagger = RT \ln\left(\frac{k_{cat, Trypsinvariante}}{k_{cat, Wildtyp}}\right) \quad (3.6)$$

für die Acylierung:

$$\Delta G_A^\ddagger = RT \ln\left(\frac{K_{m, Trypsinvariante}}{K_{m, Wildtyp}}\right) \quad (3.7)$$

und für die Substratbindung:

$$\Delta G_B = RT \ln\left(\frac{(K_{m, Substrat1} - K_{m, Substrat2}) Trypsinvariante}{(K_{m, Substrat1} - K_{m, Substrat2}) Wildtyp}\right) \quad (3.8)$$

Hierbei entspricht der  $k_{cat}$ -Wert dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und stellt entsprechend dem Reaktionschema 3.1  $k_3$  dar.  $k_3$  wiederum entspricht dem Übergang vom Acylenzymintermediat zum Produkt der Hydrolyse und gibt damit Auskunft über die Änderung der Freien Enthalpie beim Durchlaufen des tetrahedralen Intermediates der Deacylierung zwischen *wt*-Trypsin und den Trypsinvarianten (vgl. Gleichung 3.6)[213].

Der  $K_m$ -Wert hingegen beschreibt über  $K_m = \frac{k'_1 + k_2}{k_1}$  [208] sowohl die Bindung des Substrats als auch den Schritt der Acylierung des Trypsins [213]. Unter der Bedingung, das *wt*-Trypsin und Trypsinvariante das Substrat identisch einbinden, kann angenommen werden, dass der  $K_m$ -Wert, definiert als  $K_m = \frac{k'_1 + k_2}{k_1}$  mit  $K_S = \frac{k'_1}{k_1}$  (vgl. Reaktionschema 3.1), im  $K_s$ -Wert, der Dissoziationskonstanten, identisch ist. Damit liegt der Unterschied im  $K_m$ -Wert zwischen *wt*-Trypsin und Trypsinvariante nur noch in  $k_2$ , der

Acylierungsgeschwindigkeit. Gleichung 3.7 gibt dann Auskunft über die Änderungen der Freien Enthalpie, zwischen dem *wt*-Trypsin und den Trypsinvarianten während des Durchlaufens des tetrahedralen Intermediates bei der Acylierung, also beim Übergang vom MICHAELIS-MENTEN-Komplex zum Acylenzymintermediat.

Alternativ dazu kann man annehmen, dass zwei Substrate auf identische Weise die entsprechenden Übergangszustände der Acylierung innerhalb eines Trypsins durchlaufen. Damit ist  $k_2$  für zwei Substrate bei einem Trypsin gleich und der  $\Delta K_m$ -Wert nur noch von  $\Delta K_s$  abhängig. Gleichung 3.8 ergibt dann die Differenz der Freien Bindungsenthalpie zwischen *wt*-Trypsin und Trypsinvariante für entsprechend gewählte Substratpaare, welche sich in definierten Eigenschaften unterscheiden. Gewählt wurden die Substratpaare Z-K-SMe/Z-K-OMe, welche sich in der zu hydrolysierenden Bindung unterscheiden. Für das Paar Z-K-OMe/Bz-K-OMe, welches sich in der Art der *N*-terminalen Schutzgruppe unterscheidet, ergibt sich ein Unterschied zwischen Carbatat-Funktion und Benzoyl-Schutzgruppe. Des Weiteren wurde das Paar Bz-K-OMe/Bz-R-OMe verwendet, das sich in der zu erkennenden Aminosäure unterscheidet. Das letzte eingesetzte Substratpaar ist Bz-R-OMe/Bz-AARAG, welches wiederum sowohl Unterschiede in der zu hydrolysierenden Bindung als auch in der Anzahl der interagierenden Reste aufweist.

Die Änderungen der Enthalpie der Übergangszustände sind für die erzeugten Trypsinvarianten besonders interessant, da sich aus den Veränderungen im Oxyanion-Loch auch Unterschiede für die entsprechenden Energien ergeben sollten. Ein Vorteil bildet in diesem Fall die Verwendung von Substraten, bei welchen die durch die Protease zu spaltende Bindung variiert. Dafür geeignet sind Amide, Ester und Thioester, welche von Trypsin in mechanistisch analoger Weise umgesetzt werden, jedoch in ihrer Elektrophilie am Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Bindung Unterschiede aufweisen. So lassen sich Thioester leichter umsetzen als Oxo-Ester und diese wiederum leichter als das entsprechende Säureamid [214]. Unabhängig von der zu spaltenden Bindung durchlaufen die Edukte beim Umsatz durch Trypsin immer dasselbe Acylenzymintermediat, welches durch den Angriff des Serin 195 als Oxoester vorliegt [122]. Eine sich daraus ergebende Besonderheit ist, dass die erzeugten Trypsinvarianten aufgrund einer geringeren Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustands (vgl. Abbildung 1.6) leicht umzusetzende Substrate, wie die Thioester, bevorzugen sollten, wodurch das Acylenzymintermediat besonders stabil sein sollte und leicht durch Nukleophile mit einem stabilisierenden Effekt auf den tetrahedralen Zustand deacyliert werden sollte. Da es bei der Einführung von Prolin in die Trypsinvarianten zum Verlust eines Amid-Protons kommt und damit zum Verlust eines potentiellen Wasserstoffbrückendonors, sollten zweckmässig zur besseren Vergleichbarkeit die Bindungsenergie von Wasserstoffbrücken herangezogen werden. Diese können in ihrer Stärke stark variieren [215, 216], so dass nur die für Proteine typische Bindungsenergie der Wasserstoffbrücken betrachtet werden sollte [217]. Dementsprechend würde man die Stärke der Wasserstoffbrücken einteilen in: 1-4 kJ\* $\text{mol}^{-1}$  sehr schwache, unspezifische Wechselwirkung, 5-17 kJ\* $\text{mol}^{-1}$  als schwache Wasserstoffbrückenbindung, aber typisch für Protein-Substrat-Interaktionen, sowie Protein-Protein-Interaktionen und 17-63 kJ\* $\text{mol}^{-1}$  als mittelstarke Wasserstoffbrückenbindung, typisch für die Stabilisierung von Übergangszuständen [217].

### 3.3.4 Bestimmung des Effizienzparameters

Mit den in Abschnitt 3.3.1 bestimmten Acyldonoren für eine Acyltransferreaktion wurden Studien zur Bestimmung der Selektivität der S'<sub>1</sub>-Position durchgeführt. Im Gegensatz zur Untersuchung der Selektivität der S<sub>1</sub>-Position wurden diese nicht mit Hilfe von Hydrolysestudien sondern mittels Acyltransferreaktion bestimmt. Verwendung als Acylakzeptoren fanden dafür zunächst Aminosäureamide. Die erfolgreich umgesetzten Aminosäureamide sollten in anschließenden Versuchen als N-terminale Aminosäure eines Pentapeptides vom Typ Xaa-AAAG fungieren.

Für die Charakterisierung von Acyltransferreaktionen haben sich die von SCHELLENBERGER und JAKUBKE eingeführten Parameter des Partitionswertes  $p$  etabliert [51, 218]. Sie haben den Partitionswert  $p$  als Mass für das Verhältnis von Hydrolyse-  $v_H$  zu Aminolysegeschwindigkeit  $v_A$  in Abhängigkeit von der Konzentration der nukleophilen Komponente  $[H_2N - R^2]$  bestimmt, welcher sich durch

$$\frac{v_H}{v_A} = \frac{d[R - COOH]}{d[R - CO - NH - R^2]} = \frac{p}{[H_2N - R^2]} \quad (3.9)$$

definiert. Der Partitionswert entspricht dabei der Konzentration an Nukleophil ( $[H_2N - R^2]$ ), bei der Aminolyse und Hydrolyse mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen. Somit ist eine schnelle und einfache Abschätzung der Produktausbeuten bei einer Acyltransferreaktion möglich. Ebenso ist es möglich, eine Aussage über die Effizienz, mit der die nukleophile Komponente das Acylenzymintermediat deacyliert, zu treffen.

Unter den in Reaktionsschema 1.2 beschriebenen Bedingungen ergibt sich:

$$p = \frac{d[R - COOH]}{d[R - CO - NH - R^2]} [H_2N - R^2] = \frac{k_3 K_N}{k_4} + \frac{k_5}{k_4} [H_2N - R^2]' = p_0 + p_n [H_2N - R^2] \quad (3.10)$$

Aus dieser Gleichung lässt sich ableiten, dass der Partitionswert direkt linear proportional zur Nukleophil-Konzentration, unter initialen Bedingungen, ist [219]. Durch Integration unter der Annahme der Initialbedingungen erhält man:

$$\frac{[R - COOH]}{[H_2N - R^2]} = p_n + p_0 \frac{\ln\left(\frac{[H_2N - R^2]_0}{[H_2N - R^2]_0 - [R - CO - NH - R^2]}\right)}{[R - CO - NH - R^2]} \quad (3.11)$$

Diese Gleichung erlaubt die Bestimmung des Partitionswertes bei jedem Verhältnis aus Acyldonor und -akzeptor. Dabei liefert die Bestimmung von  $p_0$  Informationen über die Affinität des Nukleophils zum Acylenzym und damit über die Beschaffenheit des S'-Bindungsortes der verwendeten Protease. Nachteilig an der Bestimmung des Partitionswertes nach Gleichung 3.11 ist, dass der experimentelle Teil einen hohen Aufwand darstellt, da die Verhältnisse von Aminolyse und Hydrolyse bei verschiedenen Konzentrationen sowohl an Acyldonor, als auch an Acylakzeptor determiniert werden müssen. Eine Vereinfachung gelingt für Gleichung 3.9 unter Initialbedingungen bei Substratüberschuss zu:

$$p = \frac{[R - COOH]}{[R - CO - NH - R^2]} [H_2N - R^2] \quad (3.12)$$

Dabei ist zu beachten, dass eventuelle Abweichungen von dem linearen Verhältnis zwischen Partitionswert und Nukleophil-Konzentration unentdeckt bleiben. Dennoch ist Gleichung 3.12 von Nutzen und praktisch anwendbar [81, 220].

Um mit Hilfe des Partitionswertes die zu erwartenden Produktausbeuten für eine Protease-katalysierte Acyltransferreaktion bei entsprechenden Nukleophil-Konzentrationen abzuschätzen, gelten die beschriebenen Aussagen zum Partitionswert nur, wenn ausreichend Acyldonor und -akzeptor für den Umsatz bereitstehen. Streng genommen gelten sie nur für Serinproteasen. Es ist daher nicht möglich, den zeitlichen Verlauf der Reaktion vorherzusagen und es ist keine Aussage über Nebenreaktionen, wie Produkt- oder Sekundärhydrolyse, welche den Angriff auf die in der Acyltransferreaktion entstanden Peptidbindung beschreibt oder auf weitere Schnittstellen welche im Produkt vorhanden sind, zu treffen. Diese lassen sich im Wesentlichen durch die von GOLOBOV beschriebenen Gesetzmäßigkeiten erfassen [54]. Aufgrund des messtechnischen Aufwands erscheint jedoch die praktische Anwendung als unvorteilhaft. Eine aus der Arbeit von GOLOBOV hervorgegangene Betrachtung ist die Einführung des Parameters  $\alpha$  als Maß für die Sekundärhydrolyse [36]. Diese lässt sich in der einfachsten Form bei der Betrachtung einer sekundären Spaltstelle zum Zeitpunkt maximaler Produktausbeute bei  $\frac{d[R-CO-NH-R^2]}{dt} = 0$  berechnen mit Hilfe von [36]:

$$[R - CO - NH - R^2]_{max} = \frac{[H_2N - R^2] * [R - COO - R^1]}{p * \alpha} \quad (3.13)$$

Es ergibt sich, dass eine große Nukleophil-Konzentration und eine geringe Sekundärhydrolyse zu einer großen Produktausbeute führen. Während die Partitionskonstante zu einem großen Teil von der Nukleophil-Konzentration abhängt, ist die Sekundärhydrolyse im Wesentlichen von der Affinität der Protease zum Acyltransferprodukt abhängig. Es ist also sinnvoll, Acyldonor und -akzeptor so zu wählen, dass ein Produkt entsteht, welches wenig Affinität zum verwendeten Katalysator aufweist, wie dies beim Substratmimetikakonzept der Fall ist (siehe 1.2). Dies schließt jedoch nicht aus, dass weitere Schnittstellen im Produkt zu finden sind, welche ebenfalls zur Produkthydrolyse führen. Hier ist die Kombination aus einer Protease mit einzigartiger Schnittstelle (siehe 1.2.2) und Substratmimetikakonzept eine hervorragende Möglichkeit der Optimierung der Produktausbeuten. Eine alternative Option wäre die Verwendung einer Enzymvariante mit geringerer Sekundärhydrolyseaktivität und einer großen Aminolyserate.

Die zu erzeugenden Trypsinvarianten sollten auf diese Eigenschaften überprüft werden, da eine Untersuchung nach den oben beschriebenen Bestimmungen für den Partitionswert und die Parameter der Sekundärhydrolyse für die Beschreibung einzelner Enzym-Substrat-Kombinationen sehr exakt möglich ist. Dennoch scheint eine Untersuchung der zu erzeugenden Varianten nach diesem Prinzip als wenig ökonomisch, da dies sowohl einen hohen messtechnischen Aufwand als auch einen großen Verbrauch an Enzym und Substrat zur Folge hat. Um diesem Problem zu begegnen, soll an dieser Stelle der Begriff des Effizienzparameters  $E$  eingeführt werden.

Für die Berechnung des Effizienzparameters  $E$  sollen zunächst einige Vereinfachungen getroffen werden:

1. Bedingung: die Untersuchungen sollen bei konstanten Konzentrationen an Acyldonor und -akzeptor stattfinden
2. Bedingung: Acylakzeptor soll im Überschuss zum -donor eingesetzt werden

3. Bedingung: Anstelle des Sekundärhydrolyseparameters  $\alpha$  soll die Geschwindigkeit der Produkthydrolyse eingesetzt werden
4. Bedingung: der Effizienzparameter soll der Quotient aus dem produktbildenden Prozess der Aminolysegeschwindigkeit  $v_{Aminolyse}$  und dem produktverbrauchenden Prozess der Produkthydrolyse  $v_{Produkthydrolyse}$  sein. Um eine Relation zur Partitionskonstanten zu schaffen, soll dieser Quotient mit dem Quotienten der maximalen Produktausbeute  $[Produkt]_{max}$  und der theoretischen Produktausbeute  $[Produkt]_{theoretisch}$  multipliziert werden.

Damit ergibt sich:

$$E = \frac{v_{Aminolyse} * [Produkt]_{max}}{v_{Produkthydrolyse} * [Produkt]_{theoretisch}} \quad (3.14)$$

Limitierend für die Produktmenge ist in der betrachteten Reaktion die Konzentration an Acyldonor, so dass die maximale Produktausbeute der Konzentration an eingesetztem Acyldonor entspricht. Über die Ausbeute  $\eta = \frac{n_{tatsächliche\ Menge\ an\ Produkt}}{n_{theoretische\ Menge\ an\ Produkt}} * 100\%$  ergibt sich damit aus Gleichung 3.14:

$$E = \frac{v_{Aminolyse} * Maximale\ Ausbeute(\%)}{v_{Produkthydrolyse} * 100\%} \quad (3.15)$$

Diese Gleichung setzt voraus, dass für alle zu vergleichenden Werte die selben Ausgangsbedingungen herrschen. Das heißt, es muss eine Homogenität der Zustandsgrößen innerhalb des Messsystems herrschen. Daraus folgt, dass für alle Fälle die Puffer, Temperatur und Substratkonzentrationen übereinstimmen müssen. Verbunden mit diesen Restriktionen ergeben sich einige Nachteile:

1. Abweichungen von den Optima der Enzyme betreffend der Temperatur und Pufferbedingungen werden nur hinreichend berücksichtigt.
2. Ebenso werden betreffend der Affinitäten vor allem zur Acylakzeptorkomponente eventuelle Abweichungen nicht betrachtet.
3. Die beschriebene Methode gibt nur einen Ausschnitt der mit der Partitionskonstante und dem Parameter Sekundärhydrolyse möglichen Aussagen wieder und kann somit deren Funktionalität nicht ersetzen.

Diese Methode kann für die einfache und schnelle Untersuchung vieler Varianten des gleichen Typs als vorteilhaft angesehen werden, da sie mit relativ wenig Aufwand zu einer Aussage über die Verwendbarkeit der einzelnen Varianten für die Protease-katalysierte Acyltransferreaktion führt.

In diesem Fall ist die analytische RP-HPLC das Messsystem der Wahl. Dieses ist für Acyltransferexperimente von besonderem Vorteil, da sowohl die Produkte der Hydrolyse als auch der Aminolyse mit Hilfe der entsprechenden Referenzen zweifelsfrei in einem Analyseschritt sowohl qualitativ als auch quantitativ erfasst werden können. Ebenso werden mit entsprechend angepassten Methoden eventuelle Sekundärspaltstellen quantitativ erfasst und können bei Bedarf in die entsprechenden Betrachtungen einbezogen werden.

Ein weiterer Aspekt für einen effektiven Acyltransfer bildet die Kenntnis über die Konzentration an  $N^a$ -deprotoniertem Nukleophil, da nur die deprotonierte Spezies in der

Lage ist, den Acylrest durch einen nukleophilen Angriff zu übernehmen. Die Konzentration dieser Spezies ist entsprechend der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung

$$[H_2N - R^2] = \frac{[HN^- - R^2]}{1 + 10^{pK_s - pH}} \quad (3.16)$$

vom  $pK_s$ -Wert der  $\alpha$ -Aminogruppe und dem pH-Wert des Mediums abhängig [218]. Daher sollte sowohl der pH-Wert sorgfältig ausgewählt werden als auch eine Korrektur der Konzentration an Nukleophil entsprechend dem  $pK_s$ -Wert erfolgen.

### 3.3.5 Kinetische Parameter der Acyltransferreaktion

Die Kinetik der Acyltransferreaktion wird, wie in den Abschnitten 3.3.2 und 3.3.4 beschrieben, durch eine ganze Reihe von Teilreaktion charakterisiert (vgl. Reaktionsschema 1.2). Die bisher vorgestellten Methoden und Konstanten dienen vor allem dazu die Reaktion hinsichtlich der Optimierung für die präparative Acyltransferreaktion abzuschätzen. Für eine Betrachtung der Acyltransfereigenschaften im Vergleich zum *wt*-Trypsin scheint diese Betrachtung nicht von Vorteil zu sein. Zum einen, weil die Reaktionen als zu spezifisch für Substrat-Enzym-Paare betrachtet werden und zum anderen, weil die betreffenden Aussagen für ein Enzym relativ, also ohne die Notwendigkeit der Kenntnis der Affinitäten und Katalysegeschwindigkeiten, getroffen werden und damit nicht uneingeschränkt auf ein anderes Enzym übertragen werden können.

Für die Acyltransferreaktion essentielle Größen sind zum einen das Verhältnis zwischen Hydrolyse und Aminolyse des Acylenzymintermediates und zum anderen die Produkthydrolyse. Diese Größen beeinflussen jeweils die maximal erhaltenen Ausbeuten an Acyltransferprodukt und stellen somit essentielle Größen für den Acyltransfer dar. Wobei die Hydrolyse durch die Teilkonstante, welche die Affinität ( $K_m$ -Wert) beschreibt, und durch die Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) gekennzeichnet ist (vgl. Abschnitt 3.3.2). Ähnliches gilt für die Aminolyse des Acylenzyms, diese wird durch die Affinität des Acylenzyms zum Nukleophil bzw. Acylakzeptor mit dem  $K_N$ -Wert und durch die Wechselzahl der Aminolyse  $k_N$  beschrieben (vgl. Reaktionsschema 1.2).

Unter der Bedingung, dass die Reaktionen der untersuchten Trypsinvarianten einem *Ping-Pong*<sup>20</sup> *-bi-bi*<sup>21</sup>-Mechanismus entsprechen, lassen sich für die Bestimmung dieser Größen einige Vereinfachungen treffen. Unter der Bedingung, dass Acyldonor im sättigenden Überschuss<sup>22</sup> eingesetzt wird, kann angenommen werden, dass das Enzym vollständig als Acylenzymintermediat vorliegt und es möglich wird die Deacylierung des Acylenzyms separat zu betrachten. Es ergibt sich, dass die Bestimmung der initialen Aminolysegeschwindigkeiten bei steigender Acylakzeptorkonzentration zu v-S-Charakteristiken führen. Aus diesen kann entsprechend der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung sowohl die Affinität zum Nukleophil ( $K_N$ ) bestimmt werden als auch die maximale Aminolysegeschwindigkeit bei entsprechender Hydrolysegeschwindigkeit und damit die Katalysegeschwindigkeit der

<sup>20</sup>Der *Ping-Pong*-Mechanismus beschreibt die katalysierte Reaktion so, dass vom Enzym erst ein Substrat eingebunden und zu einem Intermediat umgesetzt werden muss und anschließend das zweite Substrat eingebunden und zum endgültigen Produkt umgesetzt werden kann [221].

<sup>21</sup>*Bi-bi* bedeutet, dass zwei Substrate zu zwei Produkten umgesetzt werden. Für die Hydrolyse eines Aminosäureesters durch Trypsin bedeutet dies, dass der Ester mit dem Substrat Wasser zur Esterabgangsgruppe und einer Aminosäure umgesetzt wird [221].

<sup>22</sup>Sättigender Überschuss bedeutet  $10 * K_m$ .

Deacylierung durch ein Nukleophil ( $k_N$ ). Aus den bestimmten Geschwindigkeiten kann man das Verhältnis zwischen Aminolyse- und Hydrolysegeschwindigkeit bestimmen. Man erhält dadurch einen idealisierten Wert für das *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten und kann diese direkt vergleichen.

Im Gegensatz zu den absoluten Werten für das Aminolyse- zu Hydrolyseverhältnis ist es für die *N*-terminale Modifizierung von Proteinen, bei der das Protein selbst das Nukleophil darstellt, nicht sinnvoll, hohe Nukleophil-Konzentrationen einzusetzen, da dies zu Problemen der Löslichkeit und zu Aggregationen<sup>23</sup> führt. Aus diesem Grund sollten in Vorbereitung einer Proteinmodifizierung die Aminolyse- zu Hydrolyseverhältnisse bei konstanter Nukleophil-Konzentration und variabler Acyldonorkonzentration durchgeführt werden. Der Erkenntnisgewinn aus diesen Versuchen lässt zu einem eine Aussage darüber zu, ob eine Acyltransferreaktion mit Acylakzeptor im Unterschuss überhaupt möglich ist, und zum anderen kann man, bedingt durch die Bestimmung der jeweiligen maximalen Umsatzgeschwindigkeit, eine Aussage über die notwendige Acyldonorkonzentration für die *N*-terminale Proteinmodifizierung treffen.

Die Analytik zu diesen Kinetiken erfolgte analog zu den in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Methoden.

Für die Sekundärhydrolyse ist ein ähnliches Vorgehen prinzipiell denkbar, indem man bei Sättigung mit Acyldonor arbeitet und mit steigender Konzentration an Acylakzeptor zu unterschiedlich großen Ausbeuten an Acyltransferprodukt gelangt und dessen Hydrolyse beobachtet [54]. Dabei ergeben sich jedoch zwei Schwierigkeiten. Zum einen muss für jede Reaktion der Zeitpunkt der maximalen Produktausbeute bestimmt werden, um entsprechend den Beginn der Produkthydrolyse bestimmen zu können, und zum anderen ist nicht eindeutig klar, ob eine Sättigung im Bezug auf das Enzym mit Acyltransferprodukt erreicht werden kann. Es wäre dementsprechend sinnvoll, die Acyltransferprodukte synthetisch bereitzustellen und entsprechend *v*-*S*-Charakteristiken zu erstellen. Der synthetische und messtechnische Aufwand gestaltet sich folglich groß und gibt aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zwischen vollständiger Acyltransferreaktion und Produkthydrolyse-reaktion nur geringfügig Auskunft darüber, wie sich die Sekundärhydrolyse bei einer Acyltransferreaktion verhält.

Alternative kann man die Acyltransferreaktionen für verschiedene Enzyme im Bezug auf die Aminolysegeschwindigkeit des Acyldonors identisch einstellen, d. h. initial sollten identische Aminolysegeschwindigkeiten erreicht werden, so dass ein annähernd identischer Anteil an Acyltransferprodukt in gleicher Zeit entsteht. Aus den resultierenden Kinetiken kann, bei gleicher, erreichter maximaler Produktausbeute, die Produkthydrolyse direkt verglichen werden. Dies führt zu einem deutlich verringerten Messaufwand und lässt direkte Aussagen zum Verhalten der Sekundärhydrolyse für verschiedene Trypsinvarianten in Acyltransferreaktionen im Vergleich zu.

Die Untersuchung der Kinetiken erfolgte nach den Methoden, wie in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben.

### 3.3.6 Proteinmodifizierung

Proteinmodifizierungen sind Veränderungen von Proteinen durch beispielsweise Glykosylierung, Phosphorylierung, Biotinylierung, Acylierung [223] und weitere Prozesse, sowie

<sup>23</sup>Aggregation beschreibt die Assoziation gleicher Moleküle zu einem größeren Verband [222].

die Prozessierung, beispielsweise von Vorläuferproteinen zu reifen Proteinen [224, 225]. Diese Prozesse sind meist natürlichen Ursprungs und haben entsprechende Bedeutung für ein Protein. Innerhalb dieser Modifizierungen nehmen Proteasen eine besondere Stellung ein, so sind sie beispielsweise verantwortlich für die Abspaltung von Signalpeptiden innerhalb eines bestimmten Transportweges [226] oder für die Überführung von Faktoren des Blutgerinnungssystems in den aktiven Zustand [227, 228]. Ebenso besitzen sie eine Relevanz für technische Fragestellungen, wie das Abspalten von *fusion-tags*<sup>24</sup> [229] oder die Fragmentierung von Proteinen für die Sequenzanalyse mittels Massenspektrometrie [230]. An diesen Beispielen wird schnell deutlich, dass die Hydrolyseaktivität von Proteasen bei deren Nutzung im Vordergrund steht. Eine Nutzung der Aminolyseaktivität ist in den meisten Fällen nicht gegeben. Die Hauptursachen dafür sind zum einen die schlechten Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse und zum anderen die Sekundärhydrolyse.

Innerhalb dieser Arbeit sollen die Varianten, die entsprechend günstigste Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse (siehe Abschnitt 3.3.4) aufweisen, dahingehend untersucht werden, ob ein Acyltransfer auf den *N*-Terminus eines Proteins möglich ist, und ob eine Proteolyse des Zielproteins weitestgehend unterbunden ist oder gar nicht stattfindet. Der Acyldonor sollte ein einfacher Ester sein, abgeleitet aus den Estern der Hydrolysestudien, welcher *N*-terminal mit einem geeigneten Chromophor versehen wurde, um eine Detektion zu vereinfachen. Der Acylakzeptor sollte ein zu modifizierendes Protein selbst darstellen. Entsprechend Reaktionsschema 1.2 stellt das Protein das Nucleophil für die Deacylierung des Acylzymintermediats dar. Aus den Ausführungen zu den Acyltransferexperimenten (siehe Abschnitt 3.3.4) ist ersichtlich, dass sowohl die Nucleophil-Konzentration als auch der pH-Wert von entscheidender Bedeutung für eine effektive Acyltransferreaktion sind. Beide Faktoren sind jedoch maßgeblich von der Beschaffenheit und Zugänglichkeit des zu modifizierenden Proteins abhängig, so dass vor allem die Konzentrationsverhältnisse zwischen Acyldonor und -akzeptor maßgeblich zu Gunsten des Acyldonors verschoben sein sollten, um einen möglichst vollständigen Acyltransfer auf das Zielprotein zu gewährleisten. Ein Vorteil, der dabei durch die Verwendung von Serinproteasen entsteht, ist der Umstand, dass eine Sekundärhydrolyse für diesen Proteasentyp weitestgehend solange ausgeschlossen werden kann, solange Acyldonor, in Form eines Esters, vorhanden ist [36].

Der Acylakzeptor, also das zu modifizierende Protein, ist Parvulin 10. Dieses wurde schon mehrfach erfolgreich *N*-terminal modifiziert und stellt aufgrund seines frei zugänglichen *N*-Terminus einen geeigneten Kandidaten für eine *N*-terminale Modifizierung dar [78]. Die *N*-terminale Peptidsequenz wurde für diese Protein entsprechend den Ergebnissen der Untersuchungen zur Selektivität angepasst. Die eigentliche Acyltransferreaktion für dieses Protein wurde mit Hilfe der Ergebnisse aus den kinetischen Untersuchungen zum Acyltransfer optimiert.

Die Analytik wurde bei diesem Experiment in drei Bereiche unterteilt. Zum einen wurde die Untersuchung der zeitlichen Verläufe und der Ausbeuten mittels RP-HPLC durchgeführt, zum anderen wurde mit Massenspektrometrie und SDS-PAGE die korrekte Modifizierung evaluiert [231] und zum dritten wurde ein Aktivitätstest für das Parvulin 10 im Vergleich zum modifizierten Parvulin 10 durchgeführt [232-234].

---

<sup>24</sup>Der Begriff *fusion-tag* leitet sich aus den Begriffen Fusion für zusammengesetzt und *tag* für Markierung ab. Er beschreibt die Markierung eines Proteins mit einer kurzen Peptidsequenz zur Veränderung der makroskopischen Eigenschaften [229].

## **Teil III: Ergebnisse und Diskussion**



## 4 Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Dissertation sollte die Übertragbarkeit des Oxyanionen-Lochs der Thioesterase auf Trypsin untersucht werden. Hierfür wurden entsprechende Mutationen in das Oxyanion-Loch von Trypsin eingeführt und die entstandenen Mutanten biochemisch charakterisiert. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Anwendbarkeit für die *N*-terminale Modifikation von Proteinen. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse vorgestellt und kritisch betrachtet.

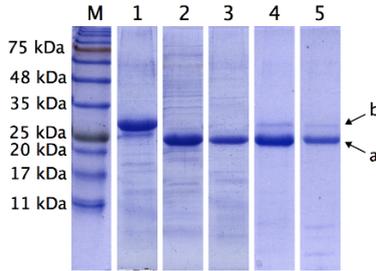
### 4.1 Generierung und Reinigung der Trypsinvarianten

#### 4.1.1 Generierung der Trypsinvarianten auf DNA-Ebene

Die Generierung der Trypsinvarianten auf DNA-Ebene erfolgte nach den etablierten Protokollen von HEDSTROM [235, 236]. Aufgrund dieser erprobten Methode (siehe Abschnitt B.2) war es möglich, alle in der Zielstellung vorgegebenen Varianten als pYT-Vektor zu generieren und in DLM 101 $\alpha$  Hefe-Zellen zu transformieren. Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe einer Sequenzierung auf ihre Richtigkeit kontrolliert (siehe Abb. C.1) und entsprachen dem Erwarteten. Die transformierten Hefezellen wurden mit den Selektionsmarkern der Leucin- und Uracildefizienz komplementiert und konnten entsprechend selektiert werden (siehe Tab. A.11 und Abb. C.4).

#### 4.1.2 Expression und Reinigung

Die Reinigung der Trypsinvarianten erfolgte nach den in Abschnitt B.3 beschriebenen Methoden. Das Reinigungsprotokoll umfasste die Überexpression der Trypsinvarianten als Trypsinogen durch Hefezellen in das Medium. Zellmaterial und andere Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Die Trypsinogene wurden mit Hilfe eines Kationentausches (Toyopearl 650M) aufkonzentriert, vom Medium abgetrennt und in Natriumacetat-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden sie in MES-Puffer überführt und mit Enterokinase aktiviert. Es erfolgte eine Trennung am Anionentauscher, sowie ein abschließender Reinigungsschritt durch Affinitätschromatographie. Der Verlauf der Reinigung ist beispielhaft für die Trypsinvariante Q192P in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1** Dokumentation der Reinigungsschritte der Trypsinvarianten am Beispiel der Trypsinvariante Q192P durch die SDS-PAGE. Bedingungen: Coomassie-gefärbtes 15%-iges Tris/Glycin-Gel. Bahnen: M - DNA-Leiter (*PageRuler<sup>TM</sup>*); 1 - Trypsinogen nach Aufreinigung mit Toyopearl 650M; 2 - nach Aktivierung mit Enterokinase; 3 - nach Reinigung mit HQ-20; Bahnen 4 und 5 Reinigung mit Affinitätschromatografie jeweils nach HQ-20, 4 - Benzamidin als Ligand, 5 - SBTI als Ligand. Bande a bei ca. 24 kDa entspricht dem aktivierten Trypsin und Bande b bei ca. 26 kDa entspricht Trypsinogen.

Der Erfolg der Reinigung der erhaltenen Enzyme wurde mittels Massenspektrometrie (siehe Abb. C.5), Chromatographie (siehe Abb. C.7) und SDS-Gelelektrophorese (siehe Abb. 4.1) kontrolliert und dokumentiert. Die erzeugten und gereinigten Trypsinvarianten entsprachen den jeweils berechneten Molekulargewichten im Massenspektrum und sind somit in ihrer Sequenz als korrekt anzusehen. Die Chromatogramme weisen eine große Homogenität der gereinigten Trypsine auf, ebenso zeigten die Elektropherogramme der Trypsinvarianten einen hohen Reinheitsgrad (vgl. Abb. 4.1 und 4.3b). Typisch für *wt*-Trypsin sind im Bereich niederer Molekulargewichte Banden<sup>1</sup>, welche vom tryptischen Selbstverdau<sup>2</sup> herrühren (siehe Abb. 4.3b Bahn 1). Der Selbstverdau des *wt*-Trypsins kann nicht im Chromatogramm und Massenspektrum (siehe Abbildung C.7 und C.5), sowie beim TLCK behandeltem *wt*-Trypsin (siehe Abbildung 4.3b Bahn 2) beobachtet werden. Dies kann auf die Probenpräparation in TLCK unbehandeltem *wt*-Trypsin zurückgeführt werden. Ebenfalls ist bei den Trypsinvarianten eine Anreicherung von Trypsinogen bei den Reinigungsschritten mittels Affinitätschromatographie zu beobachten.

Wie aus Tabelle 4.1 ersichtlich wird, zeigen die Reinigungen, sowohl von den Trypsinvarianten als auch des *wt*-Trypsin, am Anionentaucher (HQ20) einen Anteil an aktivem Trypsin von 0,9 bis 7 % am Gesamtprotein. Eine Ausnahme stellt die Variante G193P mit einem Anteil von 80 % an aktiver Spezies dar. Dieser Umstand macht eine weitere Anreicherung der aktiven Spezies, mit Ausnahme der Trypsinvariante G193P, unausweichlich. Die dafür ausgewählten affinitätschromatografischen Schritte mit den Liganden Benzamidin oder SBTI zeigen unterschiedliche Ergebnisse, sowohl in der Ausbeute als auch in der Anreicherung selbst. Die Reinigung des *wt*-Trypsins führt mit SBTI zu einem Anteil von 97 % aktiver Spezies und es wurden 75 % des Ausgangsanteils an aktivem Material erhalten. Ähnliche Ergebnisse erzielt die Reinigung vom *wt*-Trypsin mit Benzamidin, hier

<sup>1</sup>Banden sind diskrete Zonen gleicher molekularer Masse, welche in der SDS-Gelelektrophorese durch identische Moleküle hervorgerufen werden.

<sup>2</sup>Der tryptische Selbstverdau meint den proteolytischen Abbau von Trypsin durch sich selbst.

**Tabelle 4.1** Vergleich der Reinigung der Trypsinvarianten mittels Kationentauscher (Toyopearl), Anionentauscher (HQ20) und den beiden Affinitätschromatographien, mit Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI) und Benzamidin. Während die beiden Ionentauscher die Reinigungsschritte eins und zwei markieren und immer durchgeführt wurden, wurde von den Affinitätschromatographien nur je eine durchgeführt. Die Aktivität wurde durch Titration mit TLCK ermittelt. Die Proteinmenge wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Alle Ergebnisse stellen eine Doppelbestimmung aus je zwei unabhängigen Expressionen dar. Die Abweichungen der einzelnen Messungen betragen unter 5 %. Th\* - Trypsinogen, n.b. nicht bestimmt

Enzym	Reinigung	Proteinmenge (mg)	Anteil aktives Enzym (%)	(mg)	Aktivität/ Proteinmenge (%*mg <sup>-1</sup> )	Anreicherungsfaktor	Ausbeute (%)
wt-Th*	Toyopearl	34	n.b.				
	HQ20	14	4	0,6	0,3	1	100
	SBTI	0,4	97	0,4	220	540	75
wt	Benzamidin	0,7	74	0,5	112	273	85
	Toyopearl	37	n.b.				
	HQ20	15	7	1,2	0,5	1	100
Q192P-Th*	SBTI	0,5	<1	<0,005	<2	<4,3	<0,5
	Benzamidin	0,9	18	0,2	20	43	15
	Toyopearl	36	n.b.				
G183P-Th*	HQ20	15	80	12	5,4	1	100
	SBTI	0,3	<1	<0,003	<3	<0,6	0
	Benzamidin	0,3	89	0,3	330	61	2
D194P-Th*	Toyopearl	32	n.b.				
	HQ20	17	7	1,2	0,4	1	100
	SBTI	0,2	<1	<0,002	<5	<12	0
D194P	Benzamidin	0,8	25	0,2	32	78	16
	Toyopearl	39	n.b.				
	HQ20	17	5	0,8	0,3	1	100
Q192P/G193P-Th*	SBTI	0,2	<1	<0,002	<5	<17	0
	Benzamidin	0,8	40	0,4	5	17	45
	Toyopearl	38	n.b.				
G192P/D194P	HQ20	29	0,9	0,3	0,03	1	100
	SBTI	0,1	<1	<0,001	<20	<400	0
	Benzamidin	0,4	53	0,2	129	4300	80
Q192P/D194P-Th*	Toyopearl	42	n.b.				
	HQ20	27	2,8	0,8	0,1	1	100
	SBTI	0,03	<1	<0,0001	<33	<330	0
Q192P/D194P	Benzamidin	0,4	31	0,1	86	860	14

wird ein Anteil von 74 % aktiver Spezies erreicht und 85 % des aktiven Anteils bleiben erhalten.

Für die Trypsinvarianten ergibt sich für die Reinigung mit SBTI kein Anreicherungseffekt sowohl der Anteil an aktiver Spezies von unter 1 % als auch Ausbeuten von unter 1 % schließen ein Binden der Trypsinvarianten an SBTI aus. Die Anreicherung mit immobilisiertem Benzamidin hingegen führt zu einem Anteil von 18-89 % an aktiver Spezies und es werden Wiederfindungsraten von 15-80 % erreicht. Wiederholte Reinigungen an der Benzamidinsäule führten zu keiner Verbesserung.

Diesen Ergebnissen folgend, wurden alle weiteren Reinigungsschritte innerhalb dieser Arbeit nach der Reihenfolge durchgeführt: 1. Kationentauscher für die Anreicherung des Trypsinogens aus dem Kulturmedium, 2. Anionentauscher nach der Aktivierung mit Enterokinase und 3. Affinitätschromatografie mit einem Benzamidin-Trägermaterial als abschließender Reinigungsschritt. Auf die Reinigung mit SBTI wurde verzichtet.

Die Expression von Trypsin gilt im Allgemeinen als problematisch, da Trypsin als Protease cytotoxisch ist [237]. Die Expression mit Hilfe des pYT-Vektors als Trypsinogen in *Saccharomyces cerevisiae* hat daher einige Vorteile. Zum einen erfolgt die Expression unter Kontrolle des ADH/GAPDH-Promotors<sup>3</sup>, womit eine effiziente Kontrolle [238, 239] und eine starke Überexpression [240] möglich sind. Zum anderen führt die Verwendung der  $\alpha$ -Faktor-Sequenz<sup>4</sup> zur Sekretion des Trypsinogens ins Medium [85, 140]. Die Kombination aus Sekretion, kontrollierter Expression und Expression als Trypsinogen führt zu einer effizienten Minderung der Cytotoxizität und liefert im Endeffekt ein korrekt gefaltetes Trypsin [241]. Dies scheint vor allem für die erzeugten Prolinmutanten von besonderer Bedeutung zu sein, deren Erzeugung mit den angewendeten Methoden [85], sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene, ohne Schwierigkeiten möglich war.

Während die verwendeten Reinigungsmethoden im Wesentlichen den gleichen Erfolg für *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten zeigten, führte die Reinigung und Anreicherung mit Hilfe der Affinitätschromatographie zu unterschiedlichen Ergebnissen (vgl. Tab. 4.1). So zeigt die Anreicherung mit SBTI die besten Ergebnisse für die Reinigung des *wt*-Trypsins. Im Vergleich dazu ist für keine der Trypsinvarianten eine Anreicherung an aktiver Spezies mit dieser Methode möglich. Zwar führt die Anreicherung mit immobilisiertem Benzamidin im Vergleich zum immobilisiertem SBTI zu deutlich besseren Ergebnissen, aber es werden auch mit der benzamidinabhängigen Reinigung keine Ergebnisse erreicht, die dem *wt*-Trypsin entsprechen. Dies lässt im Wesentlichen eine Veränderung der Affinitäten zum Inhibitor vermuten, was wiederum auf veränderte Affinitäten zu Substraten schließen lässt. Die Beobachtung, dass Mutationen im Oxyanion-Loch von Serin-Proteasen zu veränderten Affinitäten zu Inhibitoren führen, wurde schon öfter gemacht. So befindet sich im Oxyanion-Loch des Plasminogenaktivators von *Trimeresurus stejnegeri*<sup>5</sup> ein Histidin in Position 192 und ein Phenylalanin in Position 193. Diese führen dazu, dass eine Bindung an BPTI<sup>6</sup> nicht mehr möglich ist. Hier wird vor allem diskutiert, dass die Seitenkette der Aminosäure 193 durch eine spezifische Wechselwirkung mit der P<sub>2</sub>'-Position ein

<sup>3</sup>DNA-Sequenz, die ursprünglich die Kontrolle der Expression für die Gene der Alkoholdehydrogenase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase übernommen hat.

<sup>4</sup>Die  $\alpha$ -Faktor-Sequenz ist ein Signalpeptid zur Bestimmung des Transportweges von Proteinen innerhalb der Zelle [140].

<sup>5</sup>*Trimeresurus stejnegeri* - Chinesische Bambusotter [242]

<sup>6</sup>BPTI - ist ein Kunitz-Inhibitor, welcher durch eine starke, spezifische Bindung das aktive Zentrum von Trypsin blockiert [243, 244].

Einbinden in die entsprechende Substratbindetasche verhindert [245, 246]. Ähnliches wird für menschliches Trypsin 4, welches ein Arginin anstelle des Glycin 193 aufweist [155] und einen mutierten Blutgerinnungsfaktor XIa, welcher anstelle des Glycin 193 Alanin, Arginin, Valin oder Glutamat aufweist [154], beobachtet.

Dennoch können damit die im Vergleich zum *wt*-Trypsin geringeren Anreicherungerfolge an aktiver Spezies mit immobilisiertem Benzamidin nicht erklärt werden, da sich bei dieser Reinigungsmethode die affinitätsvermittelnden Bereiche zum Benzamidin in der S<sub>1</sub>-Position befinden [148, 247]. Ein Teil der angereicherten Trypsinspezies scheint zwar das Benzamidin effektiv zu binden, aber selbst nicht mehr katalytisch aktiv zu sein (vgl. Tab. 4.1-Anteil aktives Enzym). Die Diskrepanz aus Benzamidin-bindender Spezies und der darin befindlichen aktiven Spezies lässt vermuten, dass ein Teil des erhaltenen Trypsins in seiner Struktur und Wirkweise beeinträchtigt ist.

Eine Ausnahme davon bildet die Trypsinvariante G193P. Diese erreicht ähnlich hohe Anteile an aktivem Trypsin nach der Anreicherung mit immobilisiertem Benzamidin am Gesamtproteinanteil wie das *wt*-Trypsin. Da das Glycin 193 im Oxyanion-Loch selbst als Teil einer Art  $\beta$ -Schleife<sup>7</sup> angesehen werden kann<sup>8</sup>, scheint Prolin die strukturbildende Funktion des Glycin übernehmen zu können und somit kommt es, im Kontrast zu den restlichen Trypsinvarianten, bei welchen die Regel n+3 für  $\beta$ -Schleifen nicht mehr zwingend erfüllt sein muss, zu einer ähnlichen Anreicherung des Anteils an aktiver Spezies, im Bezug auf die Benzamidin-bindenden Spezies, wie es für *wt*-Trypsin der Fall ist.

## Aktivitätstest

Die Aktivität der erzeugten Trypsinvarianten wurde mit zwei Methoden bestimmt, der *burst-phase*-Titration und der Titration mit einem Inhibitor. Diese werden hier, am Beispiel von *wt*-Trypsin und den Varianten, welche mit Enterokinase aktiviert und dem Kationentauscher HQ20 gereinigt wurden, verglichen (siehe Abb. 4.2).

Die *burst-phase*-Titration<sup>9</sup> führt bei der Bestimmung der aktiven Spezies der Trypsinvarianten mit dem Substrat Bz-D/L-R-pNA zu negativen Enzymkonzentrationen (siehe Tab. 4.2). Im Ergebnis kann  $k_2 \gg k_3$  als Grundvoraussetzung für die *burst-phase*-Methode unter den beschriebenen Bedingungen nicht mehr als gegeben betrachtet werden (siehe 3.1.3). Diese Methode ist für die Aktivitätsbestimmung der Trypsinvarianten nicht geeignet.

Alternativ erfolgte die Bestimmung der aktiven Enzymspezies durch die Titration mit einem Inhibitor. Dabei wurde die Abnahme an Aktivität gegenüber einem Substrat in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration untersucht. Als Substrat wurde Bz-D/L-R-pNA verwendet. Dieses Substrat wird durch alle erzeugten Trypsinvarianten umgesetzt. Die Wahl des Inhibitors fiel auf TLCK<sup>10</sup>.

<sup>7</sup> $\beta$ -Schleife stellt ein Sekundärstrukturelement dar, bei welchem sich die Richtung der Peptidkette um 180° ändert. Es wird dabei eine Wasserstoffbrückenbindung vom C-Terminus der 1. Aminosäure zum N-Terminus der 4. Aminosäure ausgebildet, was als n+3-Regel beschrieben wird [248]. Im Oxyanion-Loch des Trypsins wird die  $\beta$ -Schleife durch die Reste Cystein 191-Aspartat 194 gebildet.

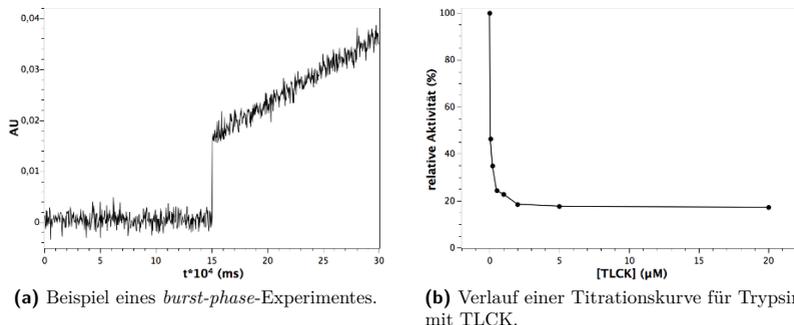
<sup>8</sup>Im Falle des Oxyanionen-Lochs werden zwar die typischen Bindungswinkel einer  $\beta$ -Schleife eingehalten und somit ähnelt dessen Struktur einer  $\beta$ -Schleife, jedoch existieren die typischen Wasserstoffbrücken einer  $\beta$ -Schleife nicht.

<sup>9</sup>Die *burst-phase*-Titration nutzt zur Bestimmung der aktiven Trypsinspezies die schnelle Reaktion eines Substrates zum Acylenzymintermediat unter Freisetzung eines Chromophors. Der Anteil an schnell freigesetztem Chromophor entspricht dabei dem Anteil an aktivem Trypsin [164, 165].

<sup>10</sup>TLCK - N<sup>α</sup>-p-Tosyl-L-lysylchloromethylketon

Ein Beispiel für die Titration mit TLCK der Variante Q192P/G193P ist in Abbildung 4.2b zu sehen. Ein Vergleich der Ergebnisse der Titration mit TLCK und den mit Hilfe der *burst-phase*-Methode bestimmten Anteilen an aktiver Enzymspezies ist in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Methoden zur Bestimmung der aktiven Spezies der gereinigten Trypsine beruhen auf zwei unterschiedlichen Prinzipien, welche unter 3.1.3 näher erläutert sind.



**Abbildung 4.2** Beispiele für die Erhebung der Daten zur Bestimmung der aktiven Trypsinspezies durch Titration des aktiven Zentrums und *burst-phase*-Experimente. - (a) Beispiel eines *burst-phase*-Experimentes der Bestimmung der aktiven Spezies von aktivem anionischen Rattentrypsin II (Wildtyp) mit dem Substrat Bz-D/L-R-pNA bei einer Wellenlänge von 310 nm. Nach Abzug des Leerwertes und Extrapolation [165] zum Zeitpunkt  $t_0$  der Substratzugabe ergibt sich bei einem Einsatz von 3,2  $\mu\text{M}$  Trypsin eine Änderung in der Absorption, welche nach dem LAMBERT-BEERSCHEN-Gesetz 129 nM aktiver Spezies entspricht. Dies stellt einen Anteil von 4 % aktivem Trypsin an der Gesamtproteinmenge dar. Bedingungen: 50  $\mu\text{M}$  Bz-D/L-R-pNA; 3,2  $\mu\text{M}$  Enzym; 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 0,01 M CaCl<sub>2</sub>; 30 °C; pH 8. - (b) Verlauf einer Titrationskurve für die Trypsinvariante Q192P/G193P mit TLCK. Die relative Aktivität wurde für das Substrat Bz-D/L-R-pNA bestimmt und gegen die Konzentration an Inhibitor aufgetragen. An die linearen Teile der resultierenden Kurve wurde jeweils eine lineare Regression angepasst und aus den Schnittpunkten beider Regressionen die Konzentration an Inhibitor ermittelt, die notwendig ist, um den enzymkatalysierten Teil der Reaktion vollständig zu inhibieren. Die beobachtete Restaktivität von 20 % resultiert aus der basenkatalysierten Hydrolyse des Substrates<sup>11</sup>. Diese Konzentration wurde ins Verhältnis zur Gesamtzymmenge gesetzt und so der Anteil an aktiver Enzymspezies ermittelt. Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 10  $\mu\text{M}$  Enzym; 25  $\mu\text{M}$  Substrat; pH 7,4; 30 °C; die Enzyme wurden 30 min ohne Substrat mit Inhibitor vorinkubiert. Jeder Messpunkt entspricht einer doppelt bestimmten, initialen Hydrolysegeschwindigkeit. Der Fehler der Regressionen betrug unter 5 %.

Die Bestimmung der aktiven Spezies mit Hilfe der Titration durch den Inhibitor TLCK liefert Ergebnisse zum spezifischen Umsatz durch die katalytischen Triade, welche Aussagen zur deren Funktionalität geben. Somit ist es mit dieser Methode möglich, unabhängig von den Bindekonstanten der Substrate, über die Reduktion der katalytischen Aktivität, Aussagen über den tatsächlichen Anteil an funktionalen katalytischen Triaden zu geben [173–176]. Für alle Trypsinvarianten konnten mit dieser Methode Anteile an aktivem Trypsin bestimmt werden.

<sup>11</sup>Meint hier die basenkatalysierte Hydrolyse des Substrates durch im Trypsin befindliche Histidine, welche nicht am eigentlichen Katalysemechanismus beteiligt sind [164].

Im Gegensatz dazu ist die *burst-phase*-Methode abhängig von den Geschwindigkeitskonstanten der Substratumsetzung. Während diese Methode für *wt*-Trypsin eindeutige Werte liefert, führt sie für die Trypsinvarianten zu negativen Ergebnissen. Der Grund dafür ist, dass die typische, schnelle Umsetzung des Substrates zum Acylenzymintermediat unter Freisetzung der chromogenen Gruppe nicht mehr mit der erforderlichen Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt und somit die mit dieser Methode bestimmten Konzentrationen an aktiver Spezies negative Werte annehmen. Die Randbedingung dieser Methode, dass die Acylierung des Trypsins viel schneller erfolgen muss als die Deacylierung, kann also nicht mehr als gegeben betrachtet werden [163–165] und macht diese Methode in Verbindung mit dem verwendeten Substrat *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-*D/L*-arginyl-4-nitroanilid ungeeignet. Dieses Substrat scheint durch die erhöhte Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff gegenüber einer Peptid- oder Esterbindung nicht mehr elektrophil genug zu sein, um vom Serin 195 schnell genug angegriffen werden zu können. Wobei zu beachten ist, dass das Oxyanionen-Loch Einfluss auf die Destabilisierung der Grundzustände im Substrat besitzt, was bei einem veränderten Oxyanionen-Loch ebenfalls Auswirkungen auf den nukleophilen Angriff durch das Serin 195 hat. Im Umkehrschluss heißt das für die Trypsinvarianten gegenüber dem *wt*-Trypsin, dass der tetrahedrale Übergangszustand vom MICHAELIS-MENTEN-Komplex zum Acylenzym weniger stabilisiert wird.

**Tabelle 4.2** Vergleich der Ergebnisse der Methoden zur Bestimmung der aktiven Trypsinspezies für die einzelnen Varianten. Die Bestimmungen wurden mit identischen Proben nach der Reinigung des mit Enterokinase aktivierten Trypsins mit dem Kationentauscher HQ20 durchgeführt. Bedingungen für die *burst-phase*-Methode: eingesetzte Proteinmenge wurde durch UV/Vis bestimmt (siehe Spalte 2); 50  $\mu\text{M}$  Bz-*D/L*-R-pNA; 0,1 M HEPES; 0,1 M NaCl; 0,01 M CaCl<sub>2</sub>; 30 °C; pH 8. Bedingungen für die Titration des aktiven Zentrums: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 10  $\mu\text{M}$  Enzym; 25  $\mu\text{M}$  Substrat; pH 7,4; 30 °C; die Enzyme wurden 30 min ohne Substrat mit Inhibitor vorinkubiert. Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen mit einer Abweichung der Einzelpunkte von unter 5 %.

<sup>a</sup> - negative Werte sind an dieser Stelle nicht real und zeigen, dass die Bedingung  $k_2 \gg k_3$  für diese Methode nicht eingehalten wird

Enzym	eingesetzte Proteinmenge nach UV/Vis ( $\mu\text{M}$ )	aktives Trypsin ( <i>burst-phase</i> ) (nM)	Anteil aktives Trypsin ( <i>burst-phase</i> ) (%)	Anteil aktives Trypsin (Titration) (%)
<i>wt</i>	3,2	129	4	4
Q192P	5	-53 <sup>a</sup>	<0	7
G193P	5	-19 <sup>a</sup>	<0	80
D194P	5	-483 <sup>a</sup>	<0	7
Q192P/G193P	10	-77 <sup>a</sup>	<0	5
G193P/D194P	10	-78 <sup>a</sup>	<0	1
Q192P/D194P	10	-125 <sup>a</sup>	<0	3

## 4.2 Untersuchung der Struktur

Aus dem Abschnitt 4.1.2 wird deutlich, dass es eine Differenz der Anteile an Trypsin, die an immobilisiertem Benzamidin binden kann und dem Anteil an aktivem Trypsin gibt (vgl. Tabelle 4.1). Daraus folgt, dass ein Teil des Trypsins nicht korrekt gefaltet sein kann bzw. dass es zu einer Verzerrung des katalytischen Zentrums kommt und damit zu einem Anteil an Benzamidin-bindenden aber nicht aktivem Trypsin. Die theoretischen Vorüberlegungen dazu sind in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2 nachzulesen.

### 4.2.1 Disulfidverbrückung

#### Ellman's-Test

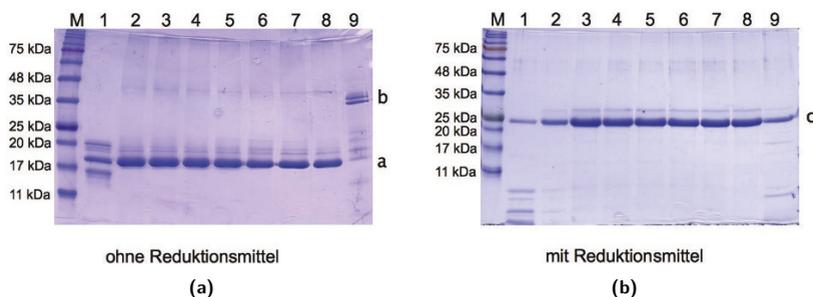
Die Ergebnisse für die Bestimmung an freien Thiolen nach ELLMAN sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Neben den erzeugten Trypsinvarianten und dem *wt*-Trypsin wurden als Referenzen die Trypsinvariante E80C und Clostripain eingesetzt. Die Variante E80C stellt einen dimerbildenden Vertreter dar und Clostripain einen Vertreter mit freiem Thiol. Im Resultat kann für Clostripain ein Thiolgehalt von 87,9% bestimmt werden, was für eine Cysteinprotease mit einer freien Thiolgruppe im aktiven Zentrum zu erwarten ist. Für die Trypsinvariante E80C könnte ein Thiolgehalt von 7,3 % bestimmt werden, dieser liegt deutlich niedriger als für Clostripain und ist zu erwarten, da zwar ein Cystein vorliegt, dieses aber mit einem weiteren E80C-Trypsin dimerisiert und somit nicht für die Bestimmung freier Thiole zugänglich ist. Für die generierten Trypsinvarianten wurden Gehalte an freiem Thiol von maximal 3,6 % an der Gesamtproteinmenge ermittelt. Es ist davon auszugehen, dass in den Trypsinvarianten keine signifikanten Anteile an freien Thiolen vorliegen und somit alle Cysteine in einer Disulfidbrücke gebunden sind.

**Tabelle 4.4** Der Gehalt an freien Thiolen wurde mit DTNB bestimmt und in Relation zur Gesamtproteinmenge gesetzt. Als Referenzen dienten Clostripain, *wt*-Trypsin und die Trypsinvariante E80C. Bedingungen: 5 M Harnstoff; 0,2 M Tris-HCl; 4 mM EDTA; pH 8,2; 25  $\mu$ M DTNB; 5-10  $\mu$ M Enzym; Extinktionskoeffizient und die Eichgerade zur Bestimmung der freien Thiole wurden mit Cystein bestimmt.

Enzym	Thiogehalt/ Proteinmenge (%)	Fehler (%)
<i>wt</i>	<0,1	0,1
Q192P	3,2	0,2
G193P	<0,1	0,1
D194P	<0,1	0,1
Q192P/G193P	1,1	0,1
G193P/D194P	3,6	0,1
Q192P/D194P	<0,1	0,1
E80C	7,3	0,3
Clostripain	87,9	2,6

## Dimerbildung

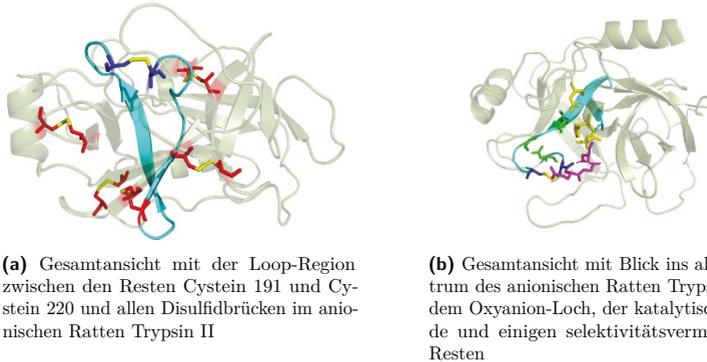
Es erfolgte, neben dem ELLMAN'S-Test, eine Kontrolle, welche die Ausbildung von Disulfid-verbrückten Dimeren untersuchte. Hierzu wurden zwei Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) angefertigt, eine ohne Reduktionsmittel und eine zweite mit Reduktionsmittel (siehe Abb. 4.3). Es wurde bei der SDS-PAGE ohne Reduktionsmittel, sowohl bei der Probenpräparation als auch bei der Vorbereitung der Gele auf Reduktionsmittel verzichtet. Als Referenzen wurden *wt*-Trypsin und die Trypsinvariante E80C verwendet. Aus dem Versuchsaufbau sind Rückschlüsse auf die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken möglich. Bahn 9 zeigt jeweils die Variante E80C, welche ohne Reduktionsmittel ein deutlich verringertes Migrationsverhalten gegenüber dem *wt*-Trypsin zeigt (Bahn 1 und 2), dies ist mit Reduktionsmittel nicht zu beobachten. Die Trypsinvariante E80C bildet unter den gegebene Bedingungen intermolekulare Disulfide. In beiden Versuchsanordnungen zeigen die Trypsinvarianten ein dem *wt*-Trypsin entsprechendes Migrationsverhalten. Von einer Dimerbildung ist demnach nicht auszugehen.



**Abbildung 4.3** SDS-PAGE der Trypsinvarianten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zur Untersuchung auf Disulfid-verbrückte Dimere. Bedingungen: 15 %iges Polyacrylamid-Gel mit einem Tris-Glycin-Puffer, aufgetragene Proteinmenge ca. 130 pmol; Molekülmassenstandard: *PageRuler™*. Abbildung (a): ohne Reduktionsmittel, (b): mit Reduktionsmittel, Bahnen: M - Molekülmassenstandard, 1 - *wt*-Trypsin, 2 - *wt*-Trypsin mit TLCK inaktiviert, 3 - Q192P, 4 - G193P, 5 - D194P, 6 - Q192P/G193P, 7 - G193P/D194P, 8 - Q192P/D194P und 9 - E80C. Die Proben wurden bei 98 °C für 5 min denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bande a - Trypsin-Monomer, Bande b - Trypsin-Dimer und Bande c - Trypsin-Monomer reduziert.

Sowohl im ELLMAN'S-Test als auch bei der Untersuchung zur Bildung von Disulfid-verbrückten Dimeren zeigt sich eindeutig, dass weder freie Thiole vorhanden sind, noch dass sich intermolekulare Disulfide bilden. Damit ist für die Verknüpfung von Cysteinen nur noch die Möglichkeit von intramolekularen Disulfiden gegeben. Aufgrund der sechs möglichen Disulfide ist eine Vielzahl an falsch ausgebildeten Disulfidbrücken möglich (vgl. Abb. 4.4). Im Falle der Trypsinvarianten muss ein falsche Disulfidverbrückung das Resultat der eingeführten Proline in den Positionen 192-194 sein und es ist vor allem mit einem Einfluss auf die benachbarte Disulfidbrücke 191-220 zu rechnen. In Folge einer falschen Disulfidverbrückung in dieser Region wäre eine korrekte Anordnung zwischen den Resten 191 und 220 aber nicht mehr denkbar. Durch die Lokalisation des Oxyanion-Lochs, des Serin 195 und einiger selektivitätsdeterminierender Bereiche in dieser Region würde es zu einer Inaktivierung der Trypsinvariante führen, wie sie in den Aktivitätstest

der erzeugten und gereinigten Trypsinvarianten beobachtet werden konnten (vgl. 4.1). Resultierend aus diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, ob ein Teil der Trypsinvarianten mit einer falschen Disulfidverbrückung und damit einem anderen Faltungszustand vorliegt. Um diese Frage zu klären, wurden entsprechende CD-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt.



**Abbildung 4.4** Anionisches Ratten Trypsin II - mit sechs Disulfidbrücken und der Region zwischen L1- und L2-Loop [178], in welcher sich das Oxyanion-Loch sowie das katalytisch aktive Serin 195 und selektivitätsdeterminierende Bereiche befinden. Das Oxyanion-Loch befindet sich dabei zwischen dem Serin 195 und dem Cystein 191 und bildet eine gewölbte Tasche in diesem Bereich. Das Glycin 193 muss in *cis*-Konformation vorliegen, da anderenfalls eine Streckung der Tasche erfolgt und somit eine Verschiebung des Serin 195 oder des Cystein 191 stattfinden würde. Damit verbunden wäre entweder eine Veränderung der Disulfidverbrückung oder eine Verzerrung der katalytischen Triade bzw. ein Verschieben der selektivitätsdeterminierenden Bereiche. Legende: transparent grün - Anionisches Rattentrypsin II, rot - Cysteine, dunkelblau - Cystein 191 und Cystein 220, cyan - Region mit den Resten 192 bis 219, grün - selektivitätsdeterminierende Bereiche mit den Resten Aspartat 189, Serin 214 und Glycin 216, gelb - katalytische Triade. PDB: 3FP6. [249]

## 4.2.2 Sekundärstruktur

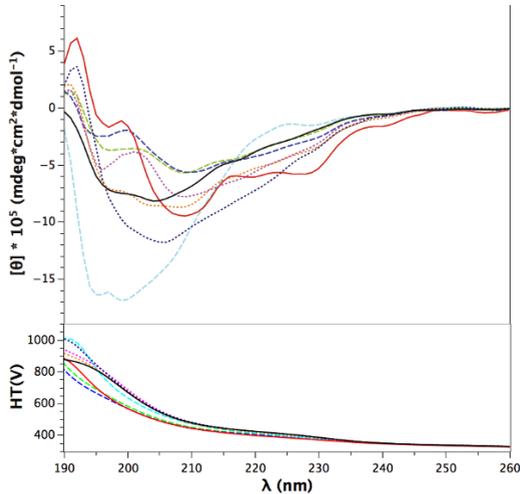
Veränderungen in der Gesamtstruktur der Trypsine sollten über die Veränderungen in den Sekundärstrukturen sichtbar werden. Hierzu kam, wie oben schon erwähnt (siehe Abschnitt 3.2.2), der Circular dichroismus im fernen UV-Bereich zum Einsatz. Es wurden von den verschiedenen Trypsinvarianten und von TLCK behandeltem *wt*-Trypsin die CD-Spektren aufgenommen.

*Wt*-Trypsin zeigt, mit Minima bei 197 nm, 208 nm und lokalen Maxima bei 199 nm, 216 nm und 224 nm mit geringer Signalintensität, einen hohen Anteil an Zufallsknäuel- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (vgl. Abb. 4.5). Während der inaktivierte Wildtyp, demgegenüber mit seinen Maxima bei 192 nm, bei 195 nm und 216 nm und seinen Minima bei 209 nm und 228 nm, deutlich mehr  $\alpha$ -helikalen Anteil als *wt*-Trypsin aufweist.

Die CD-Spektren der Trypsinvarianten weisen Unterschiede zu den beiden eben erwähnten Spektren auf. Die Trypsinvarianten Q192P und G193P sind, sowohl in der Verteilung ihrer Signale mit einem Maximum bei 201 nm und drei Minima bei 197 nm, 209 nm und 217 nm als auch in der Signalintensität annähernd identisch und lassen eine dem

*wt*-Trypsin ähnliche Verteilung der Strukturelemente mit einem hohen Anteil an Zufalls- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen vermuten.

Ebenso weisen die Varianten Q192P/G193P und Q192P/D194P eine Homologie in der Verteilung ihrer Minima bei 197 nm und 209 nm und ihren Maxima bei 201 nm auf, wenn gleich die Signalintensitäten voneinander abweichen. Auch hier scheinen, wie bei den vorangegangenen Varianten, die Anteile an Zufalls- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zu überwiegen, jedoch mit einem geringeren  $\alpha$ -helikalen Anteil.



**Abbildung 4.5** CD-Spektren der Trypsinvarianten - Legende: schwarz durchgehend - *wt*; rot durchgehend - *wt*-TLCK; grün gestrichelt - Q192P; blau gestrichelt - G193P; cyan gestrichelt - D194P; magenta gepunktet - Q192P/G193P; dunkelblau gepunktet - G193P/D194P und orange gepunktet - Q192P/D194P. Bedingungen: 15  $\mu$ M Enzym; 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 8; 20  $^\circ\text{C}$ ; aufgenommen mit einem Jasco J-810-CD-Spektrometer; 1 mm Quarzküvette.

Im Kontrast dazu weisen die Varianten D194P und G193P/D194P deutliche Unterschiede zu den vorangegangenen Varianten auf. Während die Variante G193P/D194P mit einem Minimum bei 206 nm mit erhöhter Intensität deutlich mehr  $\beta$ -Faltblatt-Struktur zeigt, ist für die Variante D194P mit den beiden Minima bei 195 nm und 199 nm und einer ebenfalls erhöhten Signalintensität eine deutliche Verschiebung zu Zufallsstrukturen und einer Verringerung des  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -helikalen-Anteils zu finden.

Der Vergleich der Berechnung der theoretischen Sekundärstrukturelemente aus der Aminosäuresequenz für *wt*-Trypsin (siehe Abb. C.8) mit dem Sekundärstrukturelementanteil der Kristallstruktur des *wt*-Trypsins (PDB-ID: 3TGI) ergaben identische Sekundärstrukturanteile. Die Berechnung des theoretischen Sekundärstrukturanteils aus der Aminosäuresequenz für die Trypsinvarianten führte zu einem dem *wt*-Trypsin homologen Sekundärstrukturanteil (vgl. Tab. 4.6). Es ist zu erwarten, dass die Trypsinvarianten entsprechend ähnliche Sekundärstrukturanteile aufweisen, wie sie beim *wt*-Trypsin zu finden sind.

**Tabelle 4.6** Ergebnisse der Berechnung der Sekundärstrukturelementanteile der Trypsinvarianten - PSIPRED: Berechnung der theoretisch möglichen Sekundärstrukturen aus der Aminosäuresequenz, Jasco - Jasco Secondary Structure Estimation: Berechnung der Sekundärstrukturen aus den Relationen von reinen Strukturelementen zu den beobachteten CD-Spektren und K2D2: die Berechnung der Sekundärstrukturelemente erfolgt direkt aus den CD-Spektren mit Bezug auf eine Proteindatenbank. Fehler: PIPRED - Vorhersage, Jasco Secondary Structure Estimation - RMS unter 26, K2D2 - RMSD unter 0,1.

Enzym	Struktur (%)	PSIPRED (%)	Jasco (%)	K2D2 (%)
<i>wt</i>	$\alpha$ -Helix	8	2	8
	$\beta$ -Faltblatt	33	52	26
	Zufallsknäuel	59	46	66
<i>wt-TLCK</i>	$\alpha$ -Helix	8	26	30
	$\beta$ -Faltblatt	33	9	14
	Zufallsknäuel	59	65	56
Q192P	$\alpha$ -Helix	8	13	15
	$\beta$ -Faltblatt	33	32	27
	Zufallsknäuel	59	55	58
G193P	$\alpha$ -Helix	8	17	15
	$\beta$ -Faltblatt	33	23	26
	Zufallsknäuel	59	60	58
D194P	$\alpha$ -Helix	8	0	8
	$\beta$ -Faltblatt	33	43	22
	Zufallsknäuel	59	57	70
Q192P/G193P	$\alpha$ -Helix	8	15	10
	$\beta$ -Faltblatt	33	24	29
	Zufallsknäuel	59	61	61
G193P/D194P	$\alpha$ -Helix	8	5	10
	$\beta$ -Faltblatt	33	53	30
	Zufallsknäuel	59	42	60
Q192P/D194P	$\alpha$ -Helix	8	9	10
	$\beta$ -Faltblatt	33	36	29
	Zufallsknäuel	59	55	61

Die Ergebnisse für die Berechnungen der Sekundärstrukturanteile aus dem CD-Spektrum für den  $\alpha$ -helicalen-Anteil beim *wt*-Trypsin entsprechen im Wesentlichen den theoretischen Vorhersagen, während es Differenzen bei den  $\beta$ -Faltblatt-Anteilen gibt (vgl. Tab. 4.6). Der

Unterschied ist vermutlich auf die unterschiedlichen Berechnungsmethoden zurückzuführen. Das Ergebnis für den TLCK inaktivierten *wt*-Trypsin hingegen zeigt Abweichungen von den Vorhersagen. Diese implizieren einen deutlich höheren Anteil an  $\alpha$ -Helices zu Ungunsten des  $\beta$ -Faltblatt-Anteils. Im Kontrast dazu stimmen die berechneten Sekundärstrukturanteile weitestgehend für die Trypsinvarianten, sowohl in Vorhersage als auch in den Berechnungen aus den CD-Spektren, für die Varianten Q192P, G193P, Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P überein. Eine Ausnahme bildet die Varianten D194P. Diese zeigt Unterschiede in den berechneten  $\beta$ -Faltblatt-,  $\alpha$ -helicalen- und Zufallsstruktur-Anteilen aus den CD-Spektren, so ergibt die Berechnung mit dem Programm Jasco Secondary Structure Estimation 0 %  $\alpha$ -Helix, 43 %  $\beta$ -Faltblatt und 57 % Zufallsstruktur, während der K2D2-Algorithmus 8 %  $\alpha$ -Helix, 22 %  $\beta$ -Faltblatt und 70 % Zufallsstruktur berechnet.

Die theoretischen Berechnungen der Sekundärstrukturen für *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten lassen keine signifikanten Unterschiede vermuten. Die Betrachtung der CD-Spektren zeigt jedoch, dass es sowohl für das inaktivierte *wt*-Trypsin als auch für die Trypsinvarianten Unterschiede gibt. Die großen Unterschiede der berechneten Sekundärstrukturanteile aus den CD-Spektren mit den Algorithmen Jasco Secondary Structure Estimation und K2D2 lassen eine direkte Vergleichbarkeit mit den theoretisch berechneten Werten (PSIPRED) schwierig erscheinen. Dennoch spiegeln auch sie die Veränderungen der Sekundärstrukturanteile innerhalb der Trypsinvarianten gegenüber dem *wt*-Trypsin wieder.

Beobachtungen, welche für die Disulfidverbrückung und Bestimmung der aktiven Spezies gemacht wurden, legen nahe, dass durch eine falsche intramolekulare Disulfidverknüpfung nur ein Teil der Gesamttrypsinmenge aktiv ist, aber dennoch durch immobilisiertes Benzamidin angereichert werden kann. Aus Abbildung 4.4 wird ersichtlich, dass eine veränderte Disulfidverbrückung zu einer beträchtlichen Veränderung der Struktur führen würde.

Im Vergleich der CD-Spektren des *wt*-Trypsins zu jenen in der Arbeit von HUANG [195] kann kein Unterschied festgestellt werden. Im Gegensatz dazu weichen die CD-Spektren der Trypsinvarianten von denen des *wt*-Trypsins ab, obgleich diese immer noch dessen Sekundärstrukturen aufweisen. Die größten Abweichung lassen sich für den TLCK-inaktivierten *wt*-Trypsin und die Trypsinvariante D194P beobachten. Beim TLCK-inaktiviertem *wt*-Trypsin liegt eine Zunahme an  $\alpha$ -helikalem Anteil in Relation zum *wt*-Trypsin vor, was den Beobachtungen von MU [250] für das Binden von kleinen Molekülen durch Trypsin entspricht. Die Trypsinvariante D194P weist wiederum einen größeren Anteil an Zufallsstruktur gegenüber dem *wt*-Trypsin auf. Die restlichen Trypsinvarianten weisen Sekundärstrukturanteile auf, die einen gesteigerten Anteil an  $\alpha$ -helikalen und zum anderen einen verringerten Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen gegenüber dem *wt*-Trypsin haben. Die beobachtete Varianz der Sekundärstrukturanteile lässt vermuten, dass die einzelnen Trypsinvarianten Unterschiede in der Reifung vom Trypsinogen zum Trypsin erfahren, da ähnliche Sekundärstrukturverhältnisse zwischen diesen beobachtet wurden [251].

Die Reifung vom Trypsinogen zum Trypsin erfolgt dabei durch Abspalten des Propeptides unter Freisetzung des *N*-Terminus am Isoleucin 16 [144, 252]. Der freigesetzte *N*-Terminus geht anschließend eine Salzbrücke<sup>12</sup> zum Aspartat 194 ein, welches zuvor

<sup>12</sup>Eine Salzbrücke ist die ionische Bindung zwischen zwei geladenen Teilchen, deren Abstand nicht größer als 4 Å ist. In Proteinen wird diese meist aus den Carbonsäurefunktionen der Aminosäuren Aspartat und Glutamat gebildet, welche mit der Ammoniumfunktion von Lysin oder der Guanidinfunktion von Arginin wechselwirken [253–255].

über eine Wasserstoffbrückenbindung an das Histidin 40 gebunden war [256]. Während dieser Umlagerung erfolgt eine Neuorientierung der Seitenkette des Aspartat 194 um  $180^\circ$  [257, 258]. Entsprechend kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteinrückgrates in diesem Bereich und das Serin 195 gelangt in das *Charge-Relay-System*<sup>13</sup> der katalytischen Triade und wird zum aktiven Serin 195 [261]. Ebenso kommt es zur Konformationsänderung des Proteinrückgrates am Glutamin 192, wodurch dieses aus der Proteinstruktur herausgelöst und zum Lösungsmittel hin exponiert wird [257, 258]. Dies befähigt die Seitenkette an der Bindung des Substrats teilzunehmen [262]. Diese Konformationsänderung lässt das Oxyanion-Loch entstehen und das Trypsinogen wird zum aktiven Trypsin. Dabei erfährt die relativ flexible Struktur des Trypsinogens eine Stabilisierung im Trypsin [257, 258, 261, 263].

Damit scheinen die Veränderung der Trypsinvarianten in den CD-Spektren nicht von einer Veränderung der Disulfidverbrückung herzurühren, sondern von der veränderten Flexibilität des Oxyanion-Lochs und dem damit verbundenen Übergang vom Trypsinogen zum Trypsin. Dies steht im Einklang mit den von WANG [139] gemachten Beobachtungen zu Mutanten der Disulfidbrücke Cystein 191-Cystein 220. Diese zeigen, in Analogie zu den in dieser Arbeit untersuchten Trypsinvarianten, ein verändertes Bindungsverhalten zu stark bindenden Inhibitoren der KUNITZ-Klasse und zu Benzamidin. Dennoch wurde ebenfalls in der Arbeit von WANG [139] festgestellt, dass diese Disulfidbrücke keinen signifikanten Einfluss, sowohl auf die Aktivität als auch auf die Struktur des anionischen Rattentrypsins II, hat. Für die in dieser Arbeit erzeugten Trypsinvarianten kann entsprechend angenommen werden, dass die Veränderungen auf eine strukturelle Änderung des Oxyanion-Lochs zurückzuführen sein müssen, welche zu keinen signifikanten Veränderungen der Sekundärstruktur führen und damit im Wesentlichen lokal auf den Bereich zwischen den Resten 192 und 219 beschränkt sind.

Es ist davon auszugehen, dass die Geometrie des Oxyanion-Lochs teilweise verändert vorliegt, da die starre Struktur der eingeführten Proline das Umklappen des Aspartat 194 und die Ausformung des Oxyanion-Lochs erschweren. Resultierend bilden sich nicht alle Oxyanion-Löcher funktional aus. Dies spiegelt sich in den veränderten CD-Spektren und in den Anteilen an nicht aktiven Trypsinspezies nach Anreicherung mit immobilisiertem Benzamidin wieder (vgl. Tabelle 4.1). Die Erklärung hierfür ist in der Funktion des Glycin 193 zu suchen, welches innerhalb des Oxyanion-Loch als Scharnier fungiert [154, 170, 264]. Das Einführen von Prolinen in das Oxyanion-Loch führt unter Umständen zu einer Streckung des Oxyanion-Lochs und damit zu einer Verschiebung des katalytisch-aktiven Serin 195 gegenüber der katalytische Triade. Die Streckung des Oxyanion-Lochs resultiert dabei aus der *cis/trans*-Isomerie der eingeführten Proline. Während die Konformation des Oxyanion-Lochs des *wt*-Trypsins einer  $\beta$ -Schleife<sup>14</sup> ähnelt und somit im Wesentlichen die beteiligten Amidbindungen in *cis*-Konformation vorliegen, führt die erhöhte Energiebarriere der *cis/trans*-Isomerie der Peptidyl-Prolyl-Bindung [265] zum Vorkommen von *trans*-Bindungen innerhalb des Oxyanion-Lochs und auch zur Störung des Übergangs vom

<sup>13</sup>Das *Charge-Relay-System* beschreibt die Fähigkeit der katalytischen Triade ein Proton vom Serin 195 zu abstrahieren und über das Histidin 57 und Aspartat 102 zu stabilisieren, um das für den Angriff des Serin 195 auf die Peptidbindung des Substrates notwendige Nukleophil zu erzeugen [259, 260].

<sup>14</sup> $\beta$ -Schleife stellt ein Sekundärstrukturelement dar, bei welchem sich die Richtung der Peptidkette um  $180^\circ$  ändert. Es wird dabei eine Wasserstoffbrückenbindung vom C-Terminus der 1. Aminosäure zum N-Terminus der 4. Aminosäure ausgebildet, was als n+3-Regel beschrieben wird [248]. Im Oxyanion-Loch des Trypsins wird die  $\beta$ -Schleife durch die Reste Cystein 191-Aspartat 194 gebildet.

Trypsinogen zum Trypsin [170]. In der Folge kommen die Trypsinvarianten in zwei Spezies vor: 1. Trypsinvarianten mit korrekt gefaltetem Oxyanion-Loch, welches sowohl Substrate binden als auch umsetzen kann und 2. Trypsinvarianten mit nicht funktionalem Oxyanion-Loch und nicht funktionaler katalytischer Triade, welche Substrate binden können, aber nicht in der Lage sind diese umzusetzen.

Dennoch bleibt zu klären, ob strukturelle Veränderungen im Bereich des Oxyanion-Lochs die Substratspezifität beeinflussen.

## 4.3 Enzymatische Charakterisierung

### 4.3.1 Hydrolysestudien

Zur Charakterisierung der  $S_1$ -Selektivität der Trypsinvarianten wurde eine Bibliothek von Standardsubstraten zu Studien der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten eingesetzt (siehe 4.3.2). Es wurde ebenfalls eine Bibliothek an Substratmimetika auf ihre Umsetzbarkeit durch die Trypsinvarianten geprüft (siehe Abschnitt 4.3.2). Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für die in Abschnitt B.3.9 beschriebene Bestimmung der kinetischen Konstanten und für die Bestimmung geeigneter Acylendonorkomponenten für die in Abschnitt 4.3.5 beschriebenen Acyltransferstudien. Die theoretischen Grundlagen dazu befinden sich in Abschnitt 3.3.1.

#### pH- und Temperatur-Optimum

Um einheitliche Bedingungen zu definieren, wurde das pH- und Temperatur-Optimum des *wt*-Trypsins und der Trypsinvarianten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Die Bestimmung des pH-Optimums der Trypsinvarianten erfolgte durch Vergleich der relativen Hydrolysegeschwindigkeiten bei verschiedenen pH-Werten für das Substrat Z-K-SMe. Die Messreihen wurden in einer Serie von GOOD's-Puffern bestimmt. Errechnet wurde das pH-Optimum mit Hilfe der GAUSS-Verteilung und der pH-Bereich, in welchem die Trypsinvarianten aktiv sind, wurde innerhalb dieser Funktion in den Grenzen von 5 % Aktivität bestimmt. Die pH-Optima zeigen nur geringfügige Unterschiede von maximal 0,2 pH-Einheiten und auch die pH-Bereiche weichen um maximal 0,5 pH-Einheiten voneinander ab. Die Temperaturoptima überspannen einen Bereich von 20 K mit einem Temperaturoptimum im unteren Bereich bei 35 °C für *wt*-Trypsin und einem Temperaturoptimum im oberen Temperaturbereich bei 55 °C für die Trypsinvariante G193P/D194P.

Resultierend aus diesen Ergebnissen sollten alle folgenden Experimente bei pH 7,8 und 30 °C durchgeführt werden. Dieser pH-Wert liegt oberhalb des pH-Optimums, sowohl für *wt*-Trypsin als auch für die Trypsinvarianten, befindet sich aber noch in dem pH-Bereich in dem alle Trypsine arbeiten und entspricht den speziellen Anforderungen der folgenden Acyltransferexperimente (vgl. Abschnitt 3.3.4). Die gewählte Temperatur liegt unter den jeweilig optimalen Temperaturbereichen, ist aber dennoch ausreichend, um alle Reaktionen zeitaufgelöst erfassen zu können.

**Tabelle 4.8** pH- und Temperatur-Optimum der Trypsinvarianten. Bedingungen pH-Optimum: [Z-K-SMe] 1 mM; [wt] 5 nM; [Q192P] 1  $\mu$ M; [G193P] 3  $\mu$ M; [D194P] 4  $\mu$ M; [Q192P/G193P] 4  $\mu$ M; [G193P/D194P] 5,8  $\mu$ M; [Q192P/D194P] 5,8  $\mu$ M; Puffer: 100 mM MES: pH 5,56; 5,84; 6,44 und 6,83; 100 mM HEPES pH 6,83; 7,25; 7,75; 8,01 und 8,43; 100 mM Bicine pH 8,43; 8,82; 9,02 und 9,36; 100 mM CAPS pH 9,81; 10,2; 10,55 und 10,96 sowie in 100 mM Acetat pH 5 und 4,5. Die Ionenstärken wurden auf 100 mM NaCl eingestellt, es wurden 1 mM CaCl<sub>2</sub> verwendet und die Temperatur betrug 30 °C. Die Aktivitäten wurden als initiale Hydrolyseraten bis zu einem maximalen Umsatz von 20 % bestimmt. Kontrollen wurden ohne Enzym durchgeführt und gegebenenfalls berücksichtigt. Die Ergebnisse wurden doppelbestimmt mit einem Fehler von unter 5 %.

Das Temperaturoptimum wurde analog zu den pH-Optima ermittelt. Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,8; [Z-K-SMe] 2mM. Der untersuchte Temperaturbereich erstreckte sich von 10 °C bis 60 °C.

Enzym	pH-Optimum	pH-Bereich	Temperaturoptimum $\theta$ °C
<i>wt</i>	7,5	6,1-8,9	35-40
Q192P	7,6	6,1-9,1	40
G193P	7,5	6,3-8,8	40
D194P	7,5	6,3-8,3	40
Q192P/G193P	7,5	6,2-8,8	40-45
G193P/D194P	7,6	6,3-8,9	55
Q192P/D194P	7,4	6,3-8,6	40

Die für die enzymatische Charakterisierung notwendige Bestimmung des pH-Optimums lieferte pH-Optima, die von denen des *wt*-Trypsins nicht abweichen und mit Literaturwerten vergleichbar sind [266–268]. Durch die eingeführten Proline sollten sich die  $pK_s$ -Werte für die aktiven Reste nicht von denen des *wt*-Trypsins unterscheiden. Ebenso zeigt der pH-Bereich, in dem die Trypsinvarianten aktiv sind, keine Veränderung zu dem des *wt*-Trypsins.

Im Gegensatz dazu zeigt das Temperaturoptimum vom *wt*-Trypsin, im Vergleich zu jenen der Trypsinvarianten, einen deutlichen Unterschied. Dies lässt auf eine thermodynamische Stabilisierung der Trypsinvarianten gegenüber dem *wt*-Trypsin schließen. Praktisch ist es aber so, dass die in der Literatur angegebenen Werte für die Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung und das Temperaturoptimum des *wt*-Trypsins deutlich über den in dieser Arbeit bestimmten Werten liegen [269–271]. Tatsächlich kann von einer unspezifischen, gesteigerten Autolysereaktion des *wt*-Trypsins bei höheren Temperaturen ausgegangen werden [272, 273], welche bei den Trypsinvarianten nicht mehr beobachtet werden kann. Damit ist die Inaktivierung bei den Trypsinvarianten thermisch bedingt, während *wt*-Trypsin durch die Autolyse limitiert ist (vgl. Abb. 4.3). Entsprechend stellt das Temperaturoptimum für die Trypsinvarianten den Wendepunkt zwischen Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit entsprechend der RGT-Regel<sup>15</sup> bei steigender Temperatur und Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Denaturierung dar.

<sup>15</sup>RGT-Regel - Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel oder VAN 'T HOFF'sche Regel besagt, dass eine Erhöhung der Temperatur um 10 K zu einer Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

Es lässt sich für die Trypsinvarianten ableiten, dass neben einer verringerten Autolyse ebenfalls eine verringerte Sekundärhydrolyseaktivität besteht und somit in entsprechenden Acyltransferreaktionen keine oder eine verringerte Produkthydrolyse gegenüber dem *wt*-Trypsin zu erwarten ist.

### 4.3.2 Initiale Hydrolysegeschwindigkeit

Die Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten dient in erster Linie dazu festzustellen, ob die erzeugten Trypsinvarianten noch zur Hydrolyse von Substraten befähigt sind und welche Selektivitätsmerkmale diese Substrate aufweisen sollten. Während die prinzipielle Hydrolyseaktivität schon mit dem Aktivitätstest bestätigt werden konnte, scheint dennoch die Möglichkeit zu bestehen, dass sowohl die Substratselektivität als auch die Substratspezifität durch die Geometrie und Wirkungsweise des Oxyanion-Lochs beeinflusst werden. Diese Vermutung wird durch zwei Tatsachen bekräftigt. Zum einen führt das Substrat *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-*D/L*-arginyl-4-nitroanilid zu einer verlangsamteten Acylierung der Trypsinvarianten im Vergleich zum *wt*-Trypsin und die Autolyseaktivität der Trypsinvarianten scheint herabgesetzt zu sein, was für eine Veränderung der Substratspezifität spricht. Und zum anderen befindet sich in unmittelbarer Nähe des Oxyanion-Lochs der Rest 189, welcher am Boden der S<sub>1</sub>-Tasche die Selektivität beeinflusst, und die Reste 214 und 216, welche ebenfalls an der Ausformung der S<sub>1</sub>-Tasche beteiligt sind.

#### Initiale Hydrolysegeschwindigkeit für ausgewählte Standardsubstrate

Die Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten zur Determination der S<sub>1</sub>-Selektivität erfolgt mit Hilfe einer Aminosäureester-Bibliothek mit *N*-terminaler Schutzgruppe vom allgemeinen Typ Bz-Xaa-OMe.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst. Im Ergebnis ist eine deutliche Präferenz des *wt*-Trypsins für basische Aminosäuren zu beobachten. So wird beim *wt*-Trypsin Bz-R-OMe wie auch Bz-K-OMe am schnellsten umgesetzt. Diesen Estern folgen Bz-F-OMe und Bz-M-OMe mit einer um die Faktoren 70 bzw. 272 verringerten Umsatzgeschwindigkeit. Ebenso wie beim *wt*-Trypsin werden auch bei den Trypsinvarianten die basischen Ester Bz-R-OMe und Bz-K-OMe am schnellsten umgesetzt. Der Argininester wird am schnellsten, sowohl vom *wt*-Trypsin als auch von den Trypsinvarianten Q192P, Q192P/G193P und Q192P/D194P, umgesetzt. Die Varianten G193P, D194P und die daraus resultierende Doppelvariante G193P/D194P hingegen setzen den Lysinester ca. 2,5 mal schneller als den Argininester um. Analog zum *wt*-Trypsin wird bei den Trypsinvarianten Q192P, G193P, D194P und Q192P/G193P der Bz-F-OMe-Ester nach den Estern Bz-R-OMe und Bz-K-OMe am schnellsten umgesetzt, hier mit Faktoren von 30-900 langsamer als vom *wt*-Trypsin. Die Trypsinvarianten G193P/D194P und Q192P/D194P setzen nach den Estern Bz-R-OMe und Bz-K-OMe die Ester Bz-E-OMe bzw. Bz-A-OMe am schnellsten um.

*Wt*-Trypsin setzt die Ester unter den hier gegebenen Bedingungen jedoch um ein vielfaches schneller um als die Varianten. Bz-R-OEt setzt *wt*-Trypsin zwischen 10-12000-fach schneller um als die Varianten. Ähnliches lässt sich für alle untersuchten Varianten und die entsprechenden Substrate beobachten.

Im Ergebnis kann festgehalten werden, dass alle Trypsinvarianten in der S<sub>1</sub>-Selektivität dem *wt*-Trypsin entsprechen und eine Präferenz für die Aminosäuren Arginin und Lysin zu beobachten ist.

Die Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der Standardsubstrate vom Typ Bz-Xaa-OMe zeigt dabei an, dass sowohl *wt*-Trypsin als auch die Trypsinvarianten in der Lage sind, Oxoester zu spalten. Ebenso ist zu erkennen, dass trotz sinkender spezifischer Aktivität die Selektivität gegenüber einzelner Seitenketten für die Trypsinvarianten und *wt*-Trypsin identisch ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Ausformung der S<sub>1</sub>-Bindetasche durch die eingeführten Proline nur gering beeinflusst wird und damit die Primärselektivität für die Trypsinvarianten erhalten bleibt.

**Tabelle 4.10** Ergebnisse der Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für Standardsubstrate. Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8; 30 °C; [Substrat] 2 mM; Trypsin: [*wt*] 3,4 nM; [Q192P] 2 µM; [G193P] 4,9 µM; [D194P] 8,9 µM; [Q192P/G193P] 3,2 µM; [G193P/D194P] 14 µM; [Q192P/D194P] 10,1 µM. Die Ergebnisse wurden doppelbestimmt und wiesen ein Fehler von unter 5 % auf. Der Gesamtumsatz an Substrat betrug maximal 20 %. Auf Spontanumsätze wurde getestet und wenn vorhanden wurden diese berücksichtigt. Die Angabe der initialen Hydrolysegeschwindigkeit erfolgt zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit als katalytische Aktivität pro Stoffmenge an Enzym.

Substrat	Enzym						
	initiale Hydrolysegeschwindigkeit (kat mol <sup>-1</sup> )						
	<i>wt</i>	Q192P	G193P	D194P	Q192P/ G193P	G193P/ D194P	Q192P/ D194P
Bz-R-OMe	351 · 10 <sup>3</sup>	30 · 10 <sup>3</sup>	3,06 · 10 <sup>3</sup>	246	7,74 · 10 <sup>3</sup>	30	64,2
Bz-K-OMe	243 · 10 <sup>3</sup>	19 · 10 <sup>3</sup>	8,2 · 10 <sup>3</sup>	438	1,8 · 10 <sup>3</sup>	78	51,6
Bz-F-OMe	5,1 · 10 <sup>3</sup>	66,6	9,0	14,4	28,2	0,18	0,31
Bz-M-OMe	1,3 · 10 <sup>3</sup>	8,4	0,78	6,0	4,2	0,1	0,35
Bz-E-OMe	260	13,8	4,7	7,4	7,2	0,3	0,06
Bz-A-OMe	195	12,6	7,8	12	6,6	0	0,51
Bz-V-OMe	96	2,1	0,8	3,6	0,8	0,1	0,21

Dennoch lassen die verringerten spezifischen Aktivitäten auf veränderte Affinitäten bzw. veränderte Acylierungs- und Deacylierungsgeschwindigkeiten schließen. Diese sind durch die veränderte Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes zu erwarten. Dennoch kann aus den spezifischen Aktivitäten weder ein Rückschluss auf ein verändertes Binde- noch auf das Umsetzungsverhalten gezogen werden, so dass die Primärselektivität und die damit in der S<sub>1</sub>-Tasche erkannten Aminosäurereste identisch zum *wt*-Trypsin sind. Unbekannt bleibt, welche Affinitäten und Katalysegeschwindigkeiten die Trypsinvarianten besitzen und welche Veränderungen gegenüber *wt*-Trypsin auftreten. Die Beantwortung dieser Frage wird in Abschnitt 4.3.3 behandelt.

### Initiale Hydrolysegeschwindigkeiten für ausgewählte Carbonsäurederivate

Beim Vergleich zwischen den Substraten Bz-R-OMe bzw. Bz-R-OEt ist festzustellen (vgl. Tab. 4.10 und 4.12), dass *wt*-Trypsin beide Substrate annähernd gleich schnell umsetzt. Ein ähnliches Verhalten ist für die Varianten D194P, G193P/D194P und Q192P/D194P zu beobachten. Die Trypsine Q192P, G193P und Q192P/G193P setzen Bz-R-OEt mit einer doppelt so großen Geschwindigkeit um als Bz-R-OMe.

Beim Vergleich der Substrathydrolyse von Z-K-SMe, Z-K-OMe und Z-K-NHMe ist zu beobachten (siehe Tab. 4.12), dass Z-K-NHMe von keinem der untersuchten Trypsine umgesetzt wird, während der Thioester besser umgesetzt wird als der korrespondierende Oxoester. Der Thioester wird vom *wt*-Trypsin ca. dreimal schneller umgesetzt als der Oxoester. Dies ist auch für die Trypsinvarianten zu beobachten. Eine Ausnahme stellt die Variante Q192P dar, diese Variante setzt den Oxoester in der initialen Hydrolyse ca. 20 % schneller um als den Thioester.

**Tabelle 4.12** Ergebnisse der Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für ausgewählte Carbonsäurederivate. Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8; 30 °C; [Substrat] 2 mM; Trypsin: [*wt*] 3,4 nM; [Q192P] 2 µM; [G193P] 4,9 µM; [D194P] 8,9 µM; [Q192P/G193P] 3,2 µM; [G193P/D194P] 14 µM; [Q192P/D194P] 10,1 µM. Die Ergebnisse wurden doppel bestimmt und wiesen ein Fehler von unter 5 % auf. Der Gesamtumsatz an Substrat betrug maximal 20 %. Auf Spontanumsätze wurde getestet und wenn vorhanden wurden diese berücksichtigt. Die Angabe der initialen Hydrolysegeschwindigkeit erfolgt zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit als katalytische Aktivität pro Stoffmenge an Enzym. k.R. - keine Reaktion

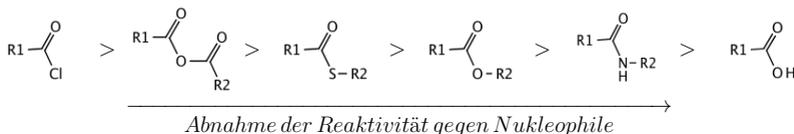
Substrat	Enzym						
	initiale Hydrolysegeschwindigkeit (kat mol <sup>-1</sup> )						
	<i>wt</i>	Q192P	G193P	D194P	Q192P/ G193P	G193P/ D194P	Q192P/ D194P
Z-K-SMe	13 · 10 <sup>6</sup>	8,8 · 10 <sup>4</sup>	1,1 · 10 <sup>3</sup>	588	13 · 10 <sup>3</sup>	96,6	110
Z-K-OMe	45 · 10 <sup>4</sup>	10 · 10 <sup>4</sup>	8,4 · 10 <sup>3</sup>	150	2,7 · 10 <sup>3</sup>	28,8	50,4
Z-K-NHMe	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.
Bz-R-OEt	34 · 10 <sup>4</sup>	5,4 · 10 <sup>4</sup>	13 · 10 <sup>3</sup>	182	15 · 10 <sup>3</sup>	38,4	52,2
Bz-AARAG	33 · 10 <sup>4</sup>	0,4 · 10 <sup>4</sup>	28,8	96	12	49,2	18,6

Das Substrat Bz-R-OEt wird vom *wt*-Trypsin mit einer ähnlich hohen initialen Hydrolysegeschwindigkeit wie Bz-AARAG umgesetzt. Die Varianten D194P, Q192P/D194P und G193P/D194P setzen das Peptid in etwa genauso so schnell um wie Bz-R-OEt. Im Gegensatz dazu setzen die Varianten Q192P, G193P und Q192P/G193P das Peptid mit initialen Hydrolysegeschwindigkeiten um, welche eine bis drei Zehnerpotenzen kleiner sind als die Umsatzgeschwindigkeiten für Bz-R-OEt.

Im Vergleich der Trypsinvarianten mit dem *wt*-Trypsin ist festzustellen, dass die Trypsinvarianten wesentlich geringere Umsatzgeschwindigkeiten aufweisen. Diese Unterschiede betragen ca. Faktor 6-9000 für das Substrat Bz-R-OEt vom *wt*-Trypsin zu Q192P bzw. G193P/D194P. Ebenso lässt sich tendenziell erkennen, dass Thioester besser als Oxoester

und diese wiederum besser umgesetzt werden als Substrate, bei denen eine Säureamid- bzw. Peptidbindung gespalten wird.

Neben der Selektivität der erzeugten Trypsinvarianten deuten sowohl das veränderte Umsatzverhalten in den *burst-phase*-Experimenten als auch die scheinbar verringerten Autolyseraten auf eine veränderte Spezifität der Trypsinvarianten hin. Einen ersten Hinweis auf diesen Umstand liefert die Umsetzung von Oxoestern, Thioestern, Säureamiden und Peptidbindungen in initialen Hydrolyse-Experimenten. Während die Ester Z-K-SMe und Z-K-OMe in ähnlichen Relationen vom *wt*-Trypsin und den Trypsinvarianten umgesetzt werden und Z-K-NHMe von keinem der getesteten Trypsine umgesetzt wird, ist der Unterschied in den initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für den Umsatz von Bz-R-OEt und Bz-AARAG vom *wt*-Trypsin zu den Trypsinvarianten deutlich zu unterscheiden. Dies lässt eine Spezifitätsveränderung bei den Trypsinvarianten vermuten bei der die zu spaltende Peptidbindung nicht mehr das bevorzugte Substrat darstellt. Dies ist besonders interessant, da ausschließlich die Acylierungsreaktion durch die verschiedenen Carbonsäurederivate beeinflusst wird. So ist der Übergang vom  $sp^2$ -hybridisierten Zustand im Substrat zum  $sp^3$ -hybridisierten Zustand im tetrahedralen Übergangszustand für alle Substrate von der Geometrie identisch, aber die verschiedenen I- und M-Effekte der Abgangsgruppen der Substrate führen zu einer unterschiedlichen Energiebarriere im  $sp^3$ -hybridisierten Zustand und damit zu einer unterschiedlichen Angreifbarkeit der Substrate durch das Serin 195 (vgl. Abb. 4.6) [274]. Daraus ergibt sich eine direkte Korrelation des Einflusses vom Oxyanion-Loch auf die Acylierungsreaktion. Man kann vermuten, dass das Oxyanion-Loch der Trypsinvarianten den tetrahedralen Übergangszustand weniger stabilisiert und damit Carbonsäurederivate mit hoher Carbonylreaktivität bevorzugt werden, was in der Folge durch größere initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für Carbonsäurederivate mit erhöhter Carbonylreaktivität zu beobachten ist.



**Abbildung 4.6** Die Carbonylreaktivität gegenüber Nucleophilen wird maßgeblich durch den I- und M-Effekt der Abgangsgruppe beeinflusst. Große -I- und -M-Effekt führen dabei zu einer leichten Angreifbarkeit des Carbonylkohlenstoffs. Verändert nach [274]. R1 und R2 entsprechen Acylresten.

### Initiale Hydrolysegeschwindigkeiten für ausgewählte Substratmimetika

Wie unter Abschnitt 1.2.2 erläutert, ist die Verwendung des Substratmimetikakonzepts eine effiziente Methode Acyltransferreaktionen durchzuführen. Um die prinzipielle Eignung der Trypsinvarianten für diesen Reaktionstyp zu verifizieren, sollte zunächst die Umsetzbarkeit einiger Substratmimetika untersucht werden. Hierzu wurde eine Auswahl von Substraten auf ihre initialen Hydrolysegeschwindigkeiten hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst.

Wie schon bei den Standardestersubstraten beobachtet, zeigen die Trypsinvarianten deutlich geringere initiale Hydrolysegeschwindigkeiten gegenüber den Substratmimetikaestern im Vergleich zum *wt*-Trypsin.

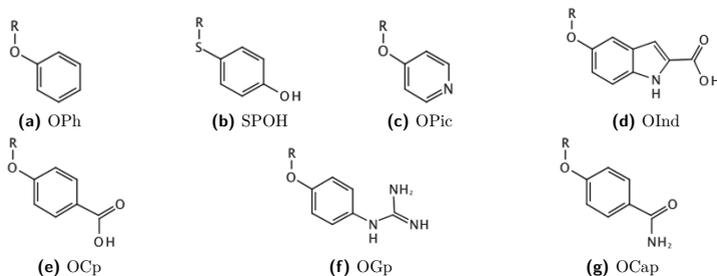
**Tabelle 4.14** Ergebnisse der Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für ausgewählte Substratmimetika. Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8; 30 °C; [Substrat] 2 mM; Trypsin: [*wt*] 3,4 nM; [Q192P] 2 µM; [G193P] 4,9 µM; [D194P] 8,9 µM; [Q192P/G193P] 3,2 µM; [G193P/D194P] 14 µM; [Q192P/D194P] 10,1 µM. Die Ergebnisse wurden doppelbestimmt und wiesen ein Fehler von unter 5 % auf. Der Gesamtumsatz an Substrat betrug maximal 20 %. Auf Spontanumsätze wurde getestet und wenn vorhanden wurden diese berücksichtigt. Die Angabe der initialen Hydrolysegeschwindigkeit erfolgt zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit als katalytische Aktivität pro Stoffmenge an Enzym. k.R. - keine Reaktion

Substrat	Enzym						
	initiale Hydrolysegeschwindigkeit (kat mol <sup>-1</sup> )						
	<i>wt</i>	Q192P	G193P	D194P	Q192P/ G193P	G193P/ D194P	Q192P/ D194P
Bz-G-OGp	16 · 10 <sup>3</sup>	228	45	276	336	38,4	58,2
Boc-A-SPOH	4,8 · 10 <sup>3</sup>	15	37,5	216	55,8	38,4	28,8
Boc-A-OPic	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.
Boc-A-OInd	1,8 · 10 <sup>3</sup>	k.R.	k.R.	216	9	k.R.	22,8
Boc-A-OCap	k.R.	k.R.	k.R.	k.R.	2,4	k.R.	29,4
Boc-A-OPh	690	k.R.	15	k.R.	2,5	k.R.	5,2
Boc-A-OCap	390	k.R.	k.R.	k.R.	2,5	k.R.	1,9

Hierbei liegt der Unterschied zum *wt*-Trypsin für Bz-G-OGp bei einem Faktor von minimal 71 bzw. maximal 420 für Q192P bzw. G193P/D194P. Ebenso spiegeln die Umsatzgeschwindigkeiten die für die Standardester bestimmten Selektivitäten der S<sub>1</sub>-Bindetasche wider. Während der Bz-G-OGp mit seiner Arginin-imitierenden Estergruppierung von allen Varianten erkannt und umgesetzt wird, zeigen die Trypsinvarianten für die übrigen Ester wenig oder gar keine Aktivität unter den gegebenen Bedingungen. Eine Ausnahme bilden die Varianten Q192P/G193P und Q192P/D194P. Diese Varianten setzen alle eingesetzten Ester um, mit der Ausnahme von Boc-A-OPic, welcher durch Q192P/D194P nicht umgesetzt wird.

Bei dem Vergleich der einzelnen Varianten im Umsatz der Substrate kann man beobachten, dass *wt*-Trypsin Boc-A-SPhOH mit einem Drittel der Umsatzgeschwindigkeit für Bz-G-OGp umsetzt. Dieses Verhältnis verbessert sich für die einzelnen Trypsinvarianten zu Gunsten des Umsatzes von Boc-A-SPhOH. Wiederum bildet die Variante G192P/G193P eine Ausnahme, mit einem Verhältnis von 1:5 zu Ungunsten des Thioesters.

Da die Verwendung von Substratmimetika sich als wertvoll für die *N*-terminale Modifizierung von Proteinen erwiesen hat [78], wurde die prinzipielle Eignung des Substratmimetikakonzeptes für die Anwendung mit den Trypsinvarianten untersucht. Für einen ersten Hinweis auf deren Eignung wurden die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten verschiedener Substratmimetika bestimmt. Die dabei bestimmten Selektivitäten für die Substratmimetika entsprechen im Wesentlichen den Beobachtungen für die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der Standardester-Bibliothek. Es werden Substratmimetika mit basischer Abgangsgruppe bevorzugt umgesetzt (vgl. Abb. 4.7).



**Abbildung 4.7** Ausgewählte Esterabgangsgruppen für die Verschiebung des Selektivitätszentrums vom Acylrest im Substrat in die Esterabgangsgruppe im Substratmimetikum. a) Phenyl, b) 4-Hydroxythiophenyl, c) Picol-4-yl, d) 2-Carboxy-1H-Indol-5-yl, e) 4-Carboxyphenyl, f) 4-Guanidinophenyl, g) 4-Carboxyaminophenyl. R entspricht in dieser Abbildung den Acylresten Bz-G oder Boc-A.

Vor allem das für Chymotrypsin und Trypsin entwickelte Substratmimetikum Bz-G-OGp [70, 219, 275, 276] wird von den Trypsinvarianten bevorzugt umgesetzt. Wie schon die Untersuchungen der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für die Umsetzung der Standardsubstrate und der Carbonsäurederivate (vgl. 4.3.2) ergeben hat, werden die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten gegenüber dem *wt*-Trypsin herabgesetzt.

**Tabelle 4.16** Relative initiale Hydrolysegeschwindigkeiten vom Standardsubstrat Bz-R-OEt und dem Substratmimetikum Bz-G-OGp für die einzelnen Trypsinvarianten und *wt*-Trypsin. Die Umsatzgeschwindigkeit des Substrates Bz-R-OEt durch *wt*-Trypsin stellt 100 % dar. Alle anderen initialen Hydrolysegeschwindigkeiten wurden auf diesen Wert bezogen. Die Ausgangswerte für die Berechnung der Relativwerte stammen aus den Tabellen 4.12 und 4.14.

Enzym	relative initiale Hydrolysegeschwindigkeit(%)	
	Bz-R-OEt	Bz-G-OGp
<i>wt</i>	100	4,8
Q192P	26	0,07
G193P	3,2	0,01
D194P	0,2	0,08
Q192P/G193P	4	0,01
G193P/D194P	0,03	0,01
Q192P/D194P	0,03	0,02

Die Herabsetzung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten der Trypsinvarianten gegenüber dem *wt*-Trypsin scheint für Substratmimetika besonders dramatisch auszufallen (vgl. Tab. 4.16). Aus den geringen Umsatzgeschwindigkeiten der Trypsinvarianten für die Substratmimetika entsteht ein Disput zwischen der Umsetzung des Substratmimetikums durch die Trypsinvarianten und der spontanen Umsetzung der Ester vom OGp-Typ [277]. Resultierend muss man davon ausgehen, dass für die erfolgreiche Anwendung des Substratmimetikakonzpts mit den Trypsinvarianten für enzymkatalysierte Acyltransferreaktionen

Katalysatorkonzentrationen eingesetzt werden müssen, die um ca. den Faktor 100-1000 höher sein müssen als es mit dem *wt*-Trypsin notwendig wäre. Dieser Umstand lässt den Einsatz des Substratmimetikakzeptes in Kombination mit den Trypsinvarianten wenig praktikabel und unwirtschaftlich erscheinen. Es ist an dieser Stelle nicht auszuschließen, dass das Substratmimetikakzept unter Verwendung der Trypsinvarianten für die Acyltransferreaktion gesteigerte Aminolysegeschwindigkeiten aufweist. Dieser Punkt wird weiter hinten untersucht (siehe Abs. 4.3.5 auf Seite 81).

### 4.3.3 Bestimmung kinetischer Konstanten für ausgewählte Substrate

Die Charakterisierung der Trypsine hinsichtlich ihrer Katalyse ist anhand von initialen Hydrolysegeschwindigkeiten nicht vollständig gegeben, da sie nur die Umsatzgeschwindigkeiten für einen Zustand beschreiben, aber keine Aussagen zur katalytischen Effizienz oder Affinitätsparametern zulassen. Die Bestimmung dieser Parameter stellt somit eine grundlegende Voraussetzung für eine genauere Charakterisierung dar. Die Auswahl der dafür notwendigen Substrate erfolgte nach den Ergebnissen der Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeit für Standardsubstrate (siehe 4.3.2). Es wurden Substrate gewählt, die zum einen der Selektivität der Trypsine genügen, zum anderen auch der verschiedenen zu spaltenden Bindungstypen. Die Wahl fiel auf den Thioester Z-K-SMe, den Oxoester Z-K-OMe, das Säureamid Z-K-NHMe, die Oxoester Bz-R-OMe sowie Bz-K-OMe und das Peptid Bz-AARAG.

Die kinetischen Konstanten wurden für die Varianten nach der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik mit Hilfe einer  $v/S$ -Charakteristik bestimmt. Für *wt*-Trypsin erfolgte die Bestimmung mit Hilfe der integrierten MICHAELIS-MENTEN-Gleichung (siehe 3.3.2). Die Ergebnisse der Bestimmung sind in Tabelle 4.18 aufgelistet.

Für alle verwendeten Substrate, außer Z-K-NHMe, konnten  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte bestimmt werden. Z-K-NHMe konnte unter den verwendeten Bedingungen von keinem Trypsin umgesetzt werden.

Global betrachtet erhält man für *wt*-Trypsin jeweils die niedrigsten  $K_m$ -Werte, die größten  $k_{cat}$ -Werte und resultierend daraus, die größte Spezifitätskonstante. Im Einzelnen kann man feststellen, dass die  $K_m$ -Werte um einen Faktor 10 bis 40 bei den Trypsinvarianten größer sind als beim *wt*-Trypsin. Die  $k_{cat}$ -Werte hingegen unterscheiden sich vom *wt*-Trypsin um den Faktor 100-10000. Eine Ausnahme bildet hier die Variante Q192P. Bei dieser Variante liegt der Unterschied in den  $k_{cat}$ -Werten zum *wt*-Trypsin bei einem Faktor von 1,6-10.

Beim Vergleich der kinetischen Konstanten der Substrate Bz-K-OMe, Bz-R-OMe und Bz-AARAG ergibt sich für den *wt*-Trypsin, dass die  $k_{cat}$ -Wert nahe zu konstant bleiben, während die  $K_m$ -Wert von Bz-K-OMe über Bz-R-OMe zu Bz-AARAG ansteigen, was zum einen aus einer verringerten Affinität zum Substrat Bz-R-OMe gegenüber Bz-K-OMe resultiert und zum anderen durch eine erschwerte Acylierung ausgehend von der Peptidbindung des Pentapeptides gegenüber den Estern. Im Vergleich dazu erhöhen sich für die Trypsinvarianten die  $K_m$ -Wert, während die  $k_{cat}$ -Werte wiederum nahe zu identisch bleiben, erneut mit Ausnahmen: bei der Variante Q192P halbiert sich der  $k_{cat}$ -Wert jeweils von Bz-K-OMe zu Bz-R-OMe zu Bz-AARAG und bei der Variante G193P ist der  $k_{cat}$ -Wert um den Faktor 70 kleiner von Bz-R-OMe zu Bz-AARAG. Damit ergeben sich für das Peptid Spezifitätskonstanten ( $k_{cat}/K_m$ ), die für die Trypsinvarianten um eine Zehnerpotenz kleiner sind als bei den korrespondierenden Estern.

**Tabelle 4.18** Bestimmung kinetischer Parameter - Die Berechnung erfolgte für die Varianten aus den initialen Hydrolysegeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration nach der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik. Für den *wt*-Trypsin erfolgte sie aus der integrierten Form der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik für die entsprechenden Produkt-Zeitabhängigkeiten nach der Gleichung  $[P] = [P_0] + [S_0] - K_m \omega \left( \frac{[S_0]}{K_m} \right) * e^{-\frac{[S_0] - [P_0]}{K_m} * t}$ . Es wurden mit je drei Substratkonzentrationen 1, 1,5 und 2 mM Substrat die Zeitabhängigkeiten dreimal bestimmt und aus den Mittelwerten die kinetischen Konstanten bestimmt. Für die Varianten wurden entsprechende v-S-Charakteristiken angefertigt indem bei verschiedenen Substratkonzentrationen die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten bestimmt wurden und entsprechend der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung ausgewertet wurden. Die Bestimmung sollte dabei in den Grenzen von  $\frac{1}{2} * K_M$  bis  $10 * K_M$  liegen. Limitiert wurden diese Werte durch die Grenzen der Löslichkeit der Substrate. Bedingungen: [Enzym] *wt*: 1,16 nM; Q192P: 0,36  $\mu$ M; G193P: 8,9  $\mu$ M; D194P: 2,5  $\mu$ M; Q192P/G193P: 0,8  $\mu$ M; G193P/D194P: 5,3  $\mu$ M; Q192P/D194P: 1,7  $\mu$ M; [Substrat]: 0,1-20 mM; Puffer: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8; 30 °C.

Substrat	Parameter	Enzym						
		Q192P	G193P	D194P	Q192P/G193P	G193P/D194P	Q192P/D194P	
Bz-AARAG	$K_{in}(\mu\text{M})$	182 ± 46	2230 ± 760	1010 ± 230	691 ± 157	5080 ± 2860	4600 ± 1920	8000 ± 3940
	$k_{cat}(s^{-1})$	27 ± 7,4	3,2 ± 0,7	0,003 ± 0,0003	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,004 ± 0,001	0,02 ± 0,009
	$k_{cat}/K_m$	2 * 0,15	2 * 1,4 · 10 <sup>-3</sup>	2 * 2,96 · 10 <sup>-6</sup>	2 * 6,9 · 10 <sup>-5</sup>	2 * 1,18 · 10 <sup>-5</sup>	2 * 9,3 · 10 <sup>-7</sup>	2 * 2,9 · 10 <sup>-6</sup>
Bz-R-OMe	$K_{in}(\mu\text{M})$	41 ± 4	490 ± 48	693 ± 131	1360 ± 410	1170 ± 490	664 ± 221	485 ± 75
	$k_{cat}(s^{-1})$	23,6 ± 2,7	6,7 ± 0,2	0,21 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,18 ± 0,04	0,002 ± 0,0003	0,02 ± 0,001
	$k_{cat}/K_m$	0,6	2 * 1,4 · 10 <sup>-2</sup>	2 * 3 · 10 <sup>-4</sup>	2 * 4,28 · 10 <sup>-5</sup>	2 * 1,5 · 10 <sup>-4</sup>	2 * 2,7 · 10 <sup>-6</sup>	2 * 4,3 · 10 <sup>-5</sup>
Bz-K-OMe	$K_{in}(\mu\text{M})$	13 ± 5	396 ± 6	308 ± 9	502 ± 200	704 ± 519	519 ± 136	815 ± 67
	$k_{cat}(s^{-1})$	25,7 ± 4,9	15 ± 0,1	0,27 ± 0,002	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,001	0,004 ± 0,0004	0,02 ± 0,001
	$k_{cat}/K_m$	2 * 2	2 * 3,8 · 10 <sup>-2</sup>	2 * 9,4 · 10 <sup>-4</sup>	2 * 1,06 · 10 <sup>-4</sup>	2 * 9,2 · 10 <sup>-5</sup>	2 * 7,7 · 10 <sup>-6</sup>	2 * 2,4 · 10 <sup>-5</sup>
Z-K-NHMe	$K_{in}(\mu\text{M})$	keine Reaktion						
	$k_{cat}(s^{-1})$	keine Reaktion						
	$k_{cat}/K_m$	keine Reaktion						
Z-K-OMe	$K_{in}(\mu\text{M})$	583 ± 26	1500 ± 162	652 ± 199	2290 ± 356	6390 ± 560	1290 ± 220	1730 ± 220
	$k_{cat}(s^{-1})$	192 ± 104	52 ± 2,5	1,1 ± 0,1	0,81 ± 0,07	2,8 ± 0,2	0,002 ± 0,0001	0,04 ± 0,002
	$k_{cat}/K_m$	2 * 0,33	2 * 3,5 · 10 <sup>-2</sup>	2 * 1,6 · 10 <sup>-5</sup>	2 * 3,5 · 10 <sup>-4</sup>	2 * 4,3 · 10 <sup>-4</sup>	2 * 1,4 · 10 <sup>-6</sup>	2 * 2,1 · 10 <sup>-5</sup>
Z-K-SMe	$K_{in}(\mu\text{M})$	166 ± 32	442 ± 48	411 ± 166	412 ± 34	2120 ± 350	349 ± 118	319 ± 87
	$k_{cat}(s^{-1})$	205 ± 42	52 ± 2	1,08 ± 0,18	0,67 ± 0,02	4,3 ± 0,7	0,006 ± 0,001	0,04 ± 0,003
	$k_{cat}/K_m$	2 * 1,2	2 * 0,01	2 * 2,6 · 10 <sup>-3</sup>	2 * 1,6 · 10 <sup>-3</sup>	2 * 2 · 10 <sup>-3</sup>	2 * 1,7 · 10 <sup>-5</sup>	2 * 1,1 · 10 <sup>-4</sup>

Die Substrate Z-K-SMe und Z-K-OMe werden von den einzelnen Trypsinvarianten und vom *wt*-Trypsin mit gleichem  $k_{cat}$ -Wert umgesetzt. Im Gegensatz dazu steigen die  $K_m$ -Werte von Z-K-SMe zu Z-K-OMe um einen Faktor von 1,5-5,5.

Im Ergebnis zeigt sich damit, dass der Thioester Z-K-SMe von allen Trypsinvarianten und vom *wt*-Trypsin besser umgesetzt wird als der Oxoester Z-K-OMe. Des Weiteren wird Lysin im Ester Bz-K-OMe besser von den Trypsinvarianten akzeptiert als Arginin im Bz-R-OMe-Ester. Eine Ausnahme bilden die Trypsinvarianten Q192P/G193P und Q192P/D194P. Das Pentapeptid Bz-AARAG wird von den Varianten deutlich schlechter umgesetzt als vom *wt*-Trypsin im Bezug auf die korrespondierenden Ester Bz-K-OMe oder Bz-R-OMe.

### 4.3.4 Energieberechnung der Übergangszustände

Um die durch Mutationen eingeführten Veränderungen im Enzym zu beschreiben, ist es sinnvoll die Energie der Übergangszustände zu betrachten. Dies ermöglicht eine genauere Abschätzung der Veränderung des Katalysemechanismus und damit eine Vorhersage über die für die kinetisch kontrollierte, reverse Proteolyse wichtigen Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten zwischen Aminolyse und Hydrolyse. Hierbei ist zu unterscheiden zwischen den Energiedifferenzen der Substratbindung  $\Delta G_B$  (siehe Tab. 4.19), der Acylierung  $\Delta G_A^\ddagger$  (siehe Tab. 4.21) und der Deacylierung  $\Delta G_D^\ddagger$  (siehe Tab. 4.23) (vgl. 3.3.2).

#### Energiedifferenz der Substratbindung

Die Energiedifferenzen der Substratbindung zwischen *wt*-Trypsin und den Trypsinvarianten sind in Tabelle 4.19 aufgelistet. Diese lassen sich in zwei Kategorien einteilen, in Werte, welche größer und welche kleiner als  $5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  sind (vgl. Abschnitt 3.3.2). Werte, welche kleiner sind, zeigen eine Energiedifferenz in der Bindung zwischen zwei verschiedenen Substratmolekülen an, welche der Energiedifferenz, wie sie im *wt*-Trypsin herrscht, sehr ähnlich und damit nicht signifikant ist. Dies ist im Wesentlichen der Fall für alle Trypsinvarianten für die Substratpaare Z-K-SMe/Z-K-OMe, und Z-K-OMe/Bz-K-OMe. Eine Ausnahme bildet die Variante Q192P/G193P. Bei dieser Variante liegen die Differenzen der Bindungsenergie für die genannten Substratkombinationen bei  $5,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Für die Substratkombinationen Bz-K-OMe/Bz-R-OMe und Bz-R-OMe/Bz-AARAG liegen die Energiedifferenzen mehrheitlich über dem Wert von  $5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , mit Ausnahme von G193P/D194P sowie Q192P für das Substratpaar Bz-K-OMe/Bz-R-OMe und G193P für die Substratkombination Bz-R-OMe/Bz-AARAG.

Werte, welche größer als  $5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  sind, beschreiben eine Änderung der Substratbindung, die in ihrem Energiegehalt in etwa einer Wasserstoffbrückenbindung entsprechen. Es ist zu beachten, dass positive Werte einen verringerten Energiegewinn anzeigen und somit ein Indikator für geringere Affinität sind. Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, einige pauschale Aussagen zu treffen. So ist es für die Trypsinvarianten nicht von Bedeutung, ob ein Oxoester (Z-K-OMe) oder ein Thioester (Z-K-SMe) gebunden wird. Ebenso scheint der Wechsel von einer *N*-terminalen Carbamat-Schutzgruppe (Z-K-OMe) zu einer Benzoyl-Schutzgruppe (Bz-K-OMe) keinen Einfluss auf die Substratbindung zu haben. Anders verhält es sich, wenn die Seitenkettenfunktion der in  $S_1$ -Position eingebundenen Aminosäure sich von Lysin (Bz-K-OMe) zu Arginin (Bz-R-OMe) verändert. Unter diesen Umständen verändern sich die Bindungsenergien deutlich zu Ungunsten der Bindung des Arginin-

haltigen Substrates in den Varianten gegenüber dem *wt*-Trypsins. Ein ähnliches Verhalten kann beobachtet werden, wenn die Anzahl der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren von Bz-R-OMe zu Bz-AARAG zunimmt. Hierbei wird die Differenz der Bindungsenergien ebenfalls zu Ungunsten der Substratbindung von Ester zu Peptid für die Trypsinvarianten in Relation zum *wt*-Trypsin verändert.

**Tabelle 4.19** Differenzen der Bindungsenergien der Trypsinvarianten für verschiedene Substrate im Vergleich zum *wt*-Trypsin. Berechnet nach:  $\Delta G_B = RT \ln \left( \frac{K_{m,Substrat1} - K_{m,Substrat2}}{(K_{m,Substrat1} - K_{m,Substrat2})^{Widtyp}} \right)$ . *Wt*-Trypsin stellt den Grundzustand dar. Die Werte wurden aus den entsprechenden Daten der Tabelle 4.18 berechnet.

Enzym	$\Delta G_B(\text{kJ mol}^{-1})$			
	Z-K-S-Me/	Z-K-OMe/	Bz-K-OMe/	Bz-R-OMe/
	Z-K-OMe	Bz-K-OMe	Bz-R-OMe	Bz-AARAG
Q192P	2,3	1,6	3,0	6,3
G193P	-1,3	-1,2	6,6	2,0
D194P	3,8	2,9	8,6	3,9
Q192P/G193P	5,8	5,8	7,1	8,3
G193P/D194P	2,0	0,8	4,1	8,4
Q192P/D194P	3,0	1,2	6,5	10

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Änderungen in den Bindungsenergien für die Trypsinvarianten im Wesentlichen von den selektivitätsdeterminierenden Gruppen und von der Anzahl der an der Interaktion beteiligten Reste beeinflusst werden.

### Energiedifferenz der Acylierung

Die Ergebnisse für die Berechnung der Energiedifferenzen der Acylierung sind in Tabelle 4.21 dargestellt. Die berechneten Änderungen in den Differenzen der Acylierungsenergie lassen sich wiederum, wie im vorangegangenen Abschnitt, in Werte unter und über  $5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  einteilen (vgl. 3.3.2). Werte unter  $5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  werden für die Substrate Z-K-SMe und Z-K-OMe beobachtet, mit der Ausnahme für die Trypsinvariante Q192P/G193P. Für die Substrate Bz-K-OMe, Bz-R-OMe und Bz-AARAG wird der Wert von  $5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  von den Trypsinvarianten übertroffen, außer von G193P und D194P für das Substrat Bz-AARAG, so dass von einer Erhöhung der Energiebarriere im tetrahedralen Übergangszustand zum Erreichen des Acylenzymintermediates für die Substrate Bz-K-OMe, Bz-R-OMe und Bz-AARAG ausgegangen werden kann. Aufgrund der geringen Größe der Beträge, welche einen Maximalwert von  $10,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  nicht überschreiten, also im Bereich einer schwachen Wasserstoffbrücke anzusiedeln sind, kann man nicht davon ausgehen, dass eine direkte Stabilisierung des Übergangszustandes vorliegt. Für die Substrate Z-K-SMe und Z-K-OMe liegen die beobachteten Energiedifferenzen noch einmal niedriger, was ebenfalls keine Beteiligung an der Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes

vermuten lässt. Das Substrat Z-K-NHMe wurde in Tabelle 4.21 der Vollständigkeit halber aufgenommen, wird aber weder vom *wt*-Trypsin noch von den Trypsinvarianten umgesetzt.

**Tabelle 4.21** Differenzen der Acylierungsenergien der Trypsinvarianten für verschiedene Substrate im Vergleich zum *wt*-Trypsin. Berechnet aus dem  $K_m$  nach:  $\Delta G_A^\ddagger = RT * \ln(\frac{K_M(\text{Variante})}{K_M(\text{wt})})$ . *Wt*-Trypsin stellt den Grundzustand dar. Die Werte wurden aus den entsprechenden Daten der Tabelle 4.18 berechnet. k.R. - keine Reaktion

Enzym	$\Delta G_A^\ddagger$ (kJ mol <sup>-1</sup> )					
	Z-K-S-Me	Z-K-OMe	Z-K-NHMe	Bz-K-OMe	Bz-R-OMe	Bz-AARAG
Q192P	-2,5	-2,4	k.R.	-8,6	-6,2	-6,3
G193P	-2,3	-0,3	k.R.	-8	-7,1	-4,3
D194P	-2,3	-3,4	k.R.	-9,2	-8,8	-3,3
Q192P/G193P	-6,4	-6	k.R.	-10	-8,4	-8,3
G193P/D194P	-1,8	-2	k.R.	-9,2	-7	-8,1
Q192P/D194P	-1,6	-2,7	k.R.	-10,4	-5,9	-9,5

Im Ergebnis lassen diese Energiebeträge einen Einfluss auf die Acylierungsreaktion erkennen, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes. Ein Einfluss auf den tetrahedralen Übergangszustand wäre aber aufgrund der stabilisierenden Funktion des Oxyanion-Lochs auf diesen zu erwarten gewesen und wird weiter hinten Diskutiert (siehe Abschnitt 4.3.4 auf Seite 73).

### Energiedifferenz der Deacylierung

Die Ergebnisse der Berechnung der Energiedifferenzen zwischen *wt*-Trypsin und den Trypsinvarianten für die Deacylierungsreaktion sind in Tabelle 4.23 aufgelistet. Bei diesen Werten liegen die Energiebeträge zwischen 11,6 und 36 kJ\*<sup>mol</sup><sup>-1</sup> und stellen somit eine Erhöhung der Energie beim Durchlaufen des tetrahedralen Übergangszustandes vom Acylenzymintermediat zum Enzym-Produkt-Komplex im Vergleich zum *wt*-Trypsin dar. Die Größenordnung der Werte liegt dabei für die Trypsinvariante Q192P zwischen 11,6 und 15,7 kJ\*<sup>mol</sup><sup>-1</sup>, also im Bereich einer schwachen Wasserstoffbrückenbindung. Damit verbunden liegt der Unterschied in der Energiedifferenz zwischen der Trypsinvariante Q192P und dem *wt*-Trypsin im Bereich einer einfachen Substrat-Protein-Interaktion. Die Energiedifferenzen vom *wt*-Trypsin zu den restlichen Trypsinvarianten für die verwendeten Substrate liegen bei einer Größenordnung von 20-36 kJ\*<sup>mol</sup><sup>-1</sup> und spiegeln eine mittelstarke Wasserstoffbrückenbindung wider. Es ist in der Folge davon auszugehen, dass vor allem durch die großen energetischen Unterschiede der Trypsinvarianten im Vergleich zum *wt*-Trypsin eine direkte Beeinflussung in der Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes bei der Deacylierungsreaktion des Serin 195 vorliegt. Die Ergebnisse für das Substrat Z-K-NHMe wurden der Vollständigkeit halber in Tabelle 4.23 aufgenommen, dieses wird aber weder vom *wt*-Trypsin noch von den Trypsinvarianten umgesetzt.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass die Trypsinvarianten im Vergleich zum *wt*-Trypsin eine starke Beeinflussung der energetischen Stabilisierung des Übergangszustandes bei der Deacylierung gegenüber den verwendeten Substraten aufweisen.

**Tabelle 4.23** Differenzen der Deacylierungsenergien der Trypsinvarianten für verschiedene Substrate im Vergleich zum *wt*-Trypsin. Berechnet aus dem  $k_{cat}$  nach:  $\Delta G_D^\ddagger = RT * \ln(\frac{k_{cat}(Variante)}{k_{cat}(wt)})$ . *Wt*-Trypsin stellt den Grundzustand dar. Die Werte wurden aus den entsprechenden Daten der Tabelle 4.18 berechnet. k.R. - keine Reaktion

Enzym	$\Delta G_D^\ddagger$ (kJ mol <sup>-1</sup> )					
	Z-K-S-Me	Z-K-OMe	Z-K-NHMe	Bz-K-OMe	Bz-R-OMe	Bz-AARAG
Q192P	-13,7	-13,6	k.R.	-11,6	-13,5	-15,7
G193P	-23,5	-23,4	k.R.	-21,8	-22,2	-33,3
D194P	-24,7	-24,1	k.R.	-25,9	-25,4	-26,4
Q192P/G193P	-20	-21	k.R.	-25,4	-22,6	-25,8
G193P/D194P	-36	-31	k.R.	-32,4	-34,2	-32,5
Q192P/D194P	-32	-31,9	k.R.	-28,4	-28,3	-28,3

Die Ergebnisse für die Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für Standardsubstrate und für die Carbonsäurederivate (siehe Abschnitt 4.3.1) ergaben deutliche Unterschiede für die Trypsinvarianten im Vergleich zum *wt*-Trypsin in den Größenordnungen der Hydrolysegeschwindigkeiten, wie auch in den Verhältnissen der Hydrolysegeschwindigkeiten für einzelne Substrate. Es lässt sich ableiten, dass Unterschiede bei der Stabilisierung der einzelnen Teilreaktionen entsprechend Reaktionsgleichung 1.2 entstehen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Bestimmung der Teilkonstanten  $k_{cat}$  und  $K_m$ , sowie der daraus bestimmten Unterschiede in den Energien der Teilreaktionen. Die Ergebnisse befinden sich in den Abschnitten 4.3.3 und 4.3.4.

Die für *wt*-Trypsin bestimmten Werte sind mit jenen, die in der Literatur zu finden sind, vergleichbar [88]. Für die Trypsinvarianten sind keine Literaturwerte bekannt. Dennoch können die ermittelten Konstanten der Trypsinvarianten zumindest teilweise mit anderen Serinproteasen, deren Oxyanion-Löcher verändert wurden, verglichen werden. Dabei ergeben sich ähnliche Tendenzen für die G193P-Mutanten von Thrombin [154], Rindertrypsin [154] und dem menschlichen Blutgerinnungsfaktor XI [264]. Die für diese Enzyme und deren Mutanten bestimmten Werte zeigen ein Absinken der  $k_{cat}$ -Werte bei steigenden  $K_m$ -Werten.

Die Untersuchungen des in dieser Arbeit verwendeten anionischen Rattentrypsin II und die entsprechenden Trypsinvarianten liefern dabei drei charakteristische Ergebnisse:

1. Die  $K_m$  -Werte erfahren eine geringere Veränderung als die  $k_{cat}$ -Wert.
2. Unterschiedliche Positionen der Proline beeinflussen die  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte auf unterschiedliche Art.
3. Die Art der zu spaltenden Bindung hat einen Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeiten.

**Die  $K_m$ -Werte erfahren eine geringere Veränderung als die  $k_{cat}$ -Wert.** Besonders auffällig scheint bei den untersuchten Trypsinvarianten zu sein, dass im Vergleich der  $k_{cat}$ -Wert deutlichere Veränderungen erfährt als der  $K_m$ -Wert. Die Teilkonstanten  $k_{cat}$  und  $K_m$  liefern Informationen über die Teilschritte der Substratbindung und der Acylierung ( $K_m$ ) sowie der Deacylierung ( $k_{cat}$ ) (vgl. Abb. 4.8). An dieser Stelle sei festzuhalten, dass die Veränderung eines  $K_m$ -Wertes einer Variante nicht unbedingt mit einer variierten Affinität zum Substrat interpretiert werden muss, sondern vielmehr auf das veränderte Verhältnis der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten, welche sich im  $K_m$ -Wert widerspiegeln, zurückgeführt werden kann [164, 165, 278]. Es ergibt sich, dass sowohl die Substratbindung als auch die Acylierung des Trypsins augenscheinlich weniger durch das Oxyanion-Loch beeinflusst wird als die Deacylierung des Trypsins. Daraus folgt, dass die energetischen Zustände beim Durchlaufen des tetrahedralen Intermediatzustands zum Acylenzymintermediat anders stabilisiert werden als beim Durchlaufen des tetrahedralen Intermediatzustands beim Deacylierungsschritt. Dies ist besonders erstaunlich, da beide tetrahedralen Zustände im Substrat energetisch ähnlich sein sollten und somit die Verringerung der Stabilisierung durch die Trypsinvarianten in beiden Zuständen ähnlich ausfallen müsste.

Betrachtet man daher die aus den katalytischen Konstanten berechneten Energien (siehe Abschnitt 4.3.4) für die Acylierung und die Deacylierung so bestätigen sie, dass die Deacylierung gegenüber der Acylierung in den Trypsinvarianten im Vergleich zum *wt*-Trypsin stärkere Veränderungen erfahren. Daraus kann man im Umkehrschluss ableiten, dass die Stabilisierung des tetrahedralen Intermediats der Acylierung durch das Oxyanion-Loch im *wt*-Trypsin weniger stabilisiert wird als das tetrahedrale Intermediat der Deacylierung. Ein Vergleich der Energiebeträge legt weiterhin offen, dass die Energiedifferenz der Trypsinvarianten im Vergleich mit dem *wt*-Trypsin während der Acylierung im Wesentlichen dem Energieanteil entspricht, welcher eine sehr schwache bis schwache Wasserstoffbrückenbindung charakterisiert<sup>16</sup>, so dass man hier nicht die Stabilisierung eines energiereichen Übergangszustandes vermuten kann, sondern vielmehr eine Substratbindung erwarten würde [217]. Im Gegenzug bewegen sich die Energiedifferenzen der Deacylierung zwischen Trypsinvarianten und *wt*-Trypsin in einem Bereich einer mittelstarken Wasserstoffbrücke und somit in einem Bereich, den man für die Stabilisierung eines energiereichen Übergangszustandes erwarten würde [217].

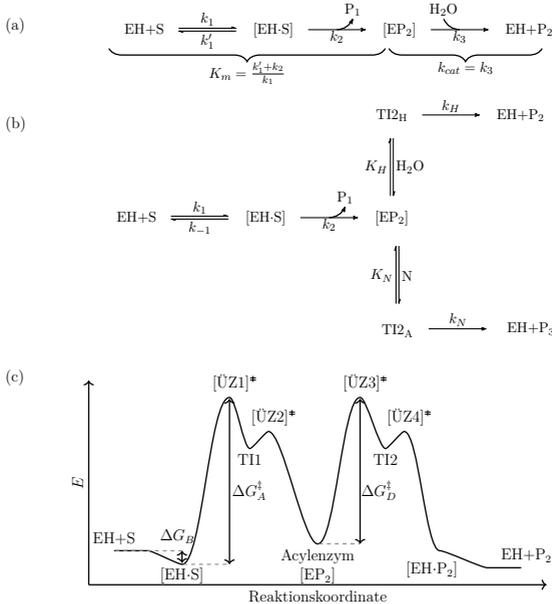
Diese Daten lassen vermuten, dass das Oxyanion-Loch im Schritt der Acylierungsreaktion die Funktion einer Substratbindetasche einnimmt und im Schritt der Deacylierung als Übergangzustandsstabilisator fungiert. Solch ein drastischer Unterschied in der Funktion sollte auch strukturell zu beobachten sein. Hierfür wurden von Frau PD Dr. Thondorf [281] entsprechende Vergleiche vom aktiven Zentrum innerhalb von Kristallstrukturen mit Übergangszustands-imitierenden Inhibitoren durchgeführt (siehe Tab. 4.25).

Im Ergebnis dieses Vergleichs konnte festgestellt werden, dass die Zustände zwischen Substratbindung vom MICHAELIS-MENTEN-Komplex bis hin zum Produkt-Enzym-Komplex für alle betrachteten Inhibitor-Enzym-Komplexe im Bezug auf die Geometrie zum Oxyanion-Loch identisch sind. Damit ist eine unterschiedliche Funktion des Oxyanion-Lochs zwischen dem Acylierungs- und Deacylierungsschritt ausgeschlossen. Eine Funktion als Substratbin-

<sup>16</sup>Die Klassifizierung von Wasserstoffbrückenbindungen kann nach dem Energiegewinn durch die Bindung erfolgen. Dabei entspricht 1-2 kJ/mol einer sehr schwachen Bindung, <17 kJ/mol einer schwachen Bindung, 17-63 kJ/mol einer mittleren Bindung und 63-167 kJ/mol einer starken Bindung [279, 280].

detasche im Acylierungsschritt kommt nicht in Betracht. Zum gleichen Ergebnis kommt auch RADISKY in seiner Arbeit von 2006 [282].

Es stellt sich die Frage, weshalb so deutliche Unterschiede zwischen dem  $K_m$ -Wert als Maß für die Acylierung und dem  $k_{cat}$ -Wert als Maß für die Deacylierung zu beobachten sind, wenn die Funktion des Oxyanion-Lochs in beiden Teilreaktion identisch ist.



**Abbildung 4.8** Vereinfachtes, schematisches Modell der Trypsin-katalysierten Hydrolysereaktion (a), Aminolysereaktion (b) und des stattfindenden Energieflusses (c). Die Dissoziationskonstante ist gegeben durch  $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$ . Legende: EH - Trypsin; S - Substrat; P<sub>123</sub> - Produkte; [EH-S], EH-P<sub>2</sub> - MICHAELIS-MENTEN-Komplex; [EP<sub>2</sub>]-Acylenzym; TI1/TI2 - Tetrahedrales Intermediat; [ÜZ1]\*, [ÜZ2]\*, [ÜZ3]\*, [ÜZ4]\* - Übergangszustände,  $\Delta G_B$  - Änderung der Bindungsenergie;  $\Delta G_A^\ddagger$  - Energiedifferenz der Acylierung;  $\Delta G_D^\ddagger$  - Energiedifferenz der Deacylierung. Eine vereinfachte Darstellung der Geometrie der Übergangszustände befindet sich in C.10.

Die Antwort kann nur im Mechanismus der Serinproteasen liegen (vgl. [122–124, 260, 283]). Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Acylierungsschritt und dem Deacylierungsschritt ist das Entstehen eines Alkoholat-Ions am Serin 195 durch die katalytische Triade in einem konzertierten Prozess mit dem Histidin 57 und dem Aspartat 102 während der Acylierung. Dieses hochreaktive Nukleophil ist leicht in der Lage eine entsprechende Ester- oder Peptidbindung im Substrat anzugreifen und durch Substitution zum Acylenzymintermediat zu gelangen. Für den Schritt der Deacylierung steht dieses Nukleophil nicht zur Verfügung, so dass der Angriff auf das Acylenzymintermediat durch Wasser erfolgen muss, welches deutlich weniger reaktiv gegenüber der Esterbindung ist als ein entsprechendes Alkoholat. Damit verbunden, spielt die Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes und damit die Verringerung der zu überwindenden Energiebarriere

für die Deacylierung eine wesentlich größere Rolle. Die Destabilisierung dieses Zustandes, durch die in den Trypsinvarianten eingeführten Proline, führt zu kleinen Veränderungen bei den  $K_m$ -Werten und zu großen Veränderungen bei den  $k_{cat}$ -Werten.

**Tabelle 4.25** Liste der verglichenen Kristallstrukturen für den Vergleich der einzelnen Zustände im Trypsin während der Katalyse.

pdb	Inhibitor	Zustand	Quelle
3FP6	BPTI	MICHAELIS-MENTEN-Komplex	[249]
1TAW	APPI	MICHAELIS-MENTEN-Komplex	[262]
1EJM	BPTI	MICHAELIS-MENTEN-Komplex	[284]
1BTZ	Peptidylboronat	tetraedraler Komplex (Acylierung)	[285]
2AH4	Guanidinobenzoyl	Acylenzym	[282]
2AGE	Succinyl-AAPR	Acylenzym	[282]
2AGG	Succinyl-AAPK	Acylenzym	[282]
2AGI	Leupeptin	tetraedraler Komplex (Deacylierung)	[282]
1NTP	Isopropylphosphat	tetraedraler Komplex (Deacylierung)	[286]
5PTP	Isopropylphosphat	tetraedraler Komplex (Deacylierung)	[287]
3FP7	BPTI (gespalten K15-A16)	Enzym-Produkt-Komplex	[249]

Resultierend sollten die erzeugten Trypsinvarianten, deren Oxyanion-Löcher den tetrahedralen Übergangszustand weniger stabilisieren, stabilere Acylenzymintermediate aufweisen, deren Deacylierung durch ein stärkeres Nukleophil, wie es beispielsweise Aminosäuren, Peptide oder Proteine als primäre Amine darstellen, besser angegriffen werden [288, 289]. Die Aminolysereaktion sollte bevorzugt vor der Hydrolysereaktion ablaufen (vgl. Abb. 4.8). Die Trypsinvarianten sollten demnach, entsprechend der Zielstellung der Arbeit (siehe Kapitel 2) für die Acyltransferreaktion besser geeignete Trypsine sein. Die Acyltransfereneigenschaften werden im Abschnitt 4.3.5 und 4.3.6 näher betrachtet.

#### **Unterschiedliche Positionen der Proline beeinflussen die $K_m$ - und $k_{cat}$ -Werte auf unterschiedliche Art.**

Die Verschlechterung der Doppelvarianten gegenüber den Einfachvarianten hinsichtlich ihrer katalytischen Effizienz scheint verständlich, wenn man bedenkt, dass das Oxyanion-Loch ein Geflecht aus Wasserstoffbrückenbindung ist, welche an der Stabilisierung des tetrahedralen Intermediates beteiligt sind [122, 124, 154, 290] und die Einführung der Proline zum Fehlen eben dieser Wasserstoffbrücken führt.

Jedoch hat nicht nur die Anzahl der in das Oxyanion-Loch eingebrachten Proline einen Einfluss auf die entsprechenden Parameter, vielmehr scheint auch die Position eine wesentliche Rolle zu spielen. Für das Substrat Z-K-OMe kommt es durch die Einführung der Proline zu einer Verringerung der  $k_{cat}$ -Werte gegenüber dem *wt*-Trypsin um einen Faktor von 3,7 für Q192P, 180 für G193P und 237 für D194P, so dass man davon ausgehen muss, dass die Wertigkeit für die Funktion der entsprechenden Reste im Oxyanion-Loch von der Position 192 zur Position 194 steigt. Dies gilt allerdings nur für die Deacylierung.

Bei der Acylierung sind die Verhältnisse zum *wt*-Trypsin um die Faktoren 2,6 für Q192P, 1,1 für G193P und 3,9 für D194P gesteigert. Hier scheint es also so, dass die Position 193 den geringsten Einfluss auf die Acylierung hat.

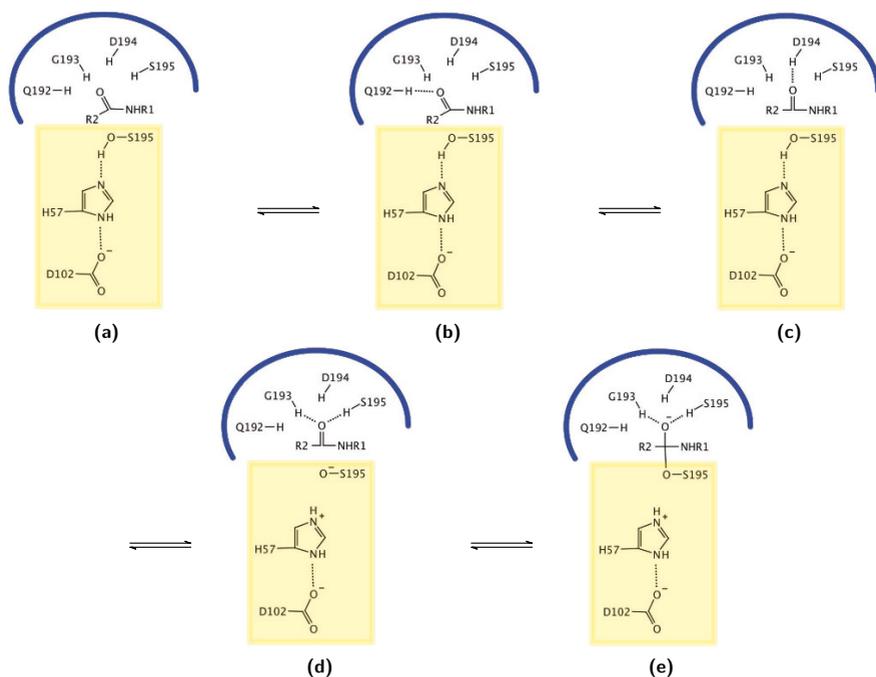
Die untersuchten Doppelvarianten zeigen wiederum ein verändertes Verhalten. Kombiniert man die beiden Einzelvarianten, welche die besseren Acylierungseigenschaften aufweisen, erhält man die Doppelvariante mit den schlechtesten Acylierungseigenschaften. Am Beispiel von Z-K-OMe ergeben sich Faktoren für den  $K_m$ -Wert im Vergleich zum *wt*-Trypsin von 11 für Q192P/G193P, 2,2 für G193P/D194P und 3 für Q192P/D194P. Für den  $k_{cat}$ -Wert ergibt die Kombination aus Einzelvarianten, welche relativ gut deacylieren, Doppelvarianten, welche ebenfalls gut deacylieren. Für Z-K-OMe bedeutet das, dass für die Doppelmutanten die Trypsinvariante Q192P/G193P den größten  $k_{cat}$ -Wert aufweist und G193P/D194P den kleinsten.

Nun stellt sich die Frage, warum einzelne Positionen unterschiedlich stark zur Stabilisierung von zwei identischen Übergangszustände im Acylierungsschritt und im Deacylierungsschritt beitragen. Betrachtet man zur Beantwortung dieser Frage Kristallstrukturen des Trypsins mit übergangszustandsanalogen Inhibitoren, kann man Wasserstoffbrücken zwischen dem Oxyanion-Loch und dem Übergangszustand-imitierenden Inhibitor beobachten [129]. Allerdings sind für den tetrahedralen Übergangszustand nur Wasserstoffbrücken vom *N*-Terminus des Serin 195 und Glycin 193 zu beobachten. Dies verwundert etwas, da man erwarten könnte, dass der Zustand der höchsten Energie die Barriere der Aktivierung darstellt und somit alle zur Stabilisierung beitragenden Reste in der Energieminimierung des tetrahedralen Übergangszustandes involviert sein sollten [291, 292]. Die Daten zu den in dieser Arbeit bestimmten Energiedifferenzen der Übergangszustände (siehe Abschnitt 4.3.4) legen nahe, dass die Positionen 192-194, aufgrund der hohen Energiedifferenzen, die durch die Mutationen entstehen, in diesen Prozess integriert sind.

Man kann entsprechend folgern, dass die Beobachtungen aus den Kristallstrukturen nur eine Momentaufnahme der Stabilisierung des tetrahedralen Intermediates darstellen. Entsprechend stabilisieren die Positionen 192 bis 194 nicht einen konkreten Zustand, sondern minimieren die Energie des Reaktionsverlaufes. Diese Annahme wird durch moleküldynamische Simulationen gestützt, in denen man zu dem Schluss kam, dass das Wasserstoffbrückengeflecht des Oxyanion-Lochs nicht zur Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes passt [293]. Es kann vermutet werden, dass das Oxyanion-Loch in einer Kaskade von Wasserstoffbrücken das Substrat in den tetrahedralen Übergangszustand führt. Damit findet eine dem *induced fit*-Modell<sup>17</sup> entsprechende Kombination aus Destabilisierung des Grundzustandes des sich im  $sp^2$ -Zustand befindlichen Carbonylkohlenstoffs und Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes des  $sp^3$ -hybridisierten Carbonylkohlenstoffs statt [292, 294, 295]. Hiermit kann erklärt werden, warum unterschiedliche Reste einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Acylierung bzw. Deacylierung haben. Entsprechend der Position innerhalb der Kaskade beeinflussen die Reste den energetischen Zustand indem sie durch Wasserstoffbrücken zum Carbonylsauerstoff Elektronendichte vom Carbonylkohlenstoff abziehen und diesen elektrophiler gestalten. Ein Angriff des Serin 195 wird begünstigt. Eine weitere Begünstigung der Reaktion liegt in der Stabilisierung des

<sup>17</sup>Unter dem *induced fit*-Modell versteht man die strukturelle Veränderung des Proteins nach der Einbindung des Substrates unter einer Verringerung der Spezifität gegenüber dem Substrat zugunsten einer auf den Übergangszustand optimierten Konstitution [294].

tetrahedralem Übergangszustand als Zustand höchster Energie durch die Reste 193 und 195. Dieser begünstigt ebenfalls den nukleophilen Angriff des Serin 195.



**Abbildung 4.9** Schematisches Modell der Stabilisierung und Destabilisierung vom MICHAELIS-MENTEN-Komplex zum tetraedreren Übergangszustand mit dem Durchlaufen der Einzelzustände innerhalb einer Kaskade von Wasserstoffbrücken am Beispiel von Trypsin. Abbildung (a) stellt das gebundene Substrat dar und entspricht dem MICHAELIS-MENTEN-Komplex. (b) Dieser wird durch eine Wasserstoffbrücke von der NH-Gruppe des Glutamin 192 zum Carbonylsauerstoff des Substrates destabilisiert und (c) kann weitergereicht werden zur destabilisierenden Wasserstoffbrücke der NH-Gruppe des Aspartat 194 zum Carbonylsauerstoff, von welchem aus die Stabilisierung des Carbonylsauerstoffs durch die NH-Gruppe der Reste 193 und 195 erreichbar sind. Mit diesem Schritt erfolgt die Deprotonierung des Serin 195 und damit verbunden der nukleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff. (e) Resultierend entsteht der tetraedralem Übergangszustand, welcher durch die Reste 193 und 195 stabilisiert wird. Das Verlassen des tetraedreren Übergangszustandes erfolgt in umgekehrter Weise. Die Reste 192 und 194 wirken in diesem Modell destabilisierend auf den Grundzustand, während die Reste 193 und 195 stabilisierend auf den Übergangszustand wirken. Blauer Bogen - Oxyanion-Loch, gelb hinterlegt - katalytische Triade. Diese Abbildung stellt eine Erweiterung zum generellen Mechanismus von Serinproteasen nach HEDSTROM dar [122].

Sowohl durch FOURIER-Transformations-Infrarotspektroskopie als auch durch RAMAN-Spektroskopie konnte die Destabilisierung von Acylenzymintermediaten durch das Oxyanion-Loch beobachtet werden [296–299]. Dennoch ging man in diesen Arbeiten davon aus, dass ausschließlich Glycin 193 und Serin 195 an dieser Destabilisierung beteiligt sind, da dies den Arbeiten zu den Kristallstrukturen [129, 258, 261] entsprach und man nur den Acyl-

rest mit der RAMAN-Spektroskopie und FOURIER-Transformations-Infrarotspektroskopie beobachtet hat.

Wie kann man sich eine Wasserstoffbrücken-Kaskade im Oxyanion-Loch vorstellen? Betrachtet man dazu die Beiträge der einzelnen Reste hinsichtlich ihrer Energie ergibt sich, dass Glutamin 192 am wenigsten, Glycin 193 moderat und Aspartat 194 am meisten zur Stabilisierung beitragen (vgl. Abschnitt 4.3.4). Entsprechend der Funktion einer Kaskade<sup>18</sup> müsste man davon ausgehen, dass vom ACYLENZYM oder vom MICHAELIS-MENTEN-Komplex beginnend die Reste, in der Abfolge wenig Energie bis hin zu viel Energie beisteuernd, den Weg zum tetrahedralen Komplex säumen müssten. Da aber bekannt ist, dass der Rest 193 zusammen mit dem Rest 195 den Zustand höchster Energie stabilisiert und damit die Stabilisierungsenergie von zwei Resten einfließt, ändert sich die Kaskade in die Folge 192 → 194 → 193/195 (siehe Abb. 4.9). Dieser Verlauf der Stabilisierung der Konformationsänderung vom sp<sup>2</sup>- in den sp<sup>3</sup>-hybridisierten Übergangszustand stimmt mit der Theorie von KOSHLAND überein, welche besagt, dass sich das Protein nach Substrateinbindung der Stabilisierung des Übergangszustandes anpasst [294].

Ebenfalls kann so erklärt werden, wie in dem konzertierten Mechanismus die Aktivierung des Serin 195 erfolgt. Indem die Übertragung entlang der Wasserstoffbrücken-Kaskade erfolgt, wird das Serin 195 in die ideale Position innerhalb der katalytischen Triade gezogen, welche in ihrem letzten Schritt das Alkoxid des Serin 195 und das Substrat im tetrahedralen Übergangszustand vereint.

Die Postulierung einer solchen Kaskade vereint dabei sowohl die Daten der Destabilisierung des Acylenzyms, wie sie durch TONG und WHITE [296–299] beobachtet wurden, als auch die Beobachtungen von ROBERTUS, HUBER und MARQUART [129, 258, 261], dass nur Glycin 193 und Serin 195 den tetrahedralen Übergangszustand stabilisieren. Auch die Berechnungen von SIMON [293], bei welchem die Geometrie des Wasserstoffbrückengeflechts nach einem statischen Modell der Stabilisierung nicht zu einer Reaktion mit durchlaufenem tetrahedralen Übergangszustand passt und die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, dass die Reste 192–194 an der Stabilisierung der Übergangszustände beteiligt sind, stützen diese These.

Zusammenfassung: Das Oxyanionen-Loch nach dem klassischen Modell von ROBERTUS [129], bestehend aus Glycin 193 und Serin 195, muss um Glutamin 192 und Aspartat 194 erweitert werden. Damit verbunden ist das statische Modell von ROBERTUS, um einen dynamischen Anteil zu erweitern, welcher neben der reinen Stabilisierung des tetrahedralen Intermediates auch den energetischen Pfad zum tetrahedralen Intermediat energetische minimiert. Entsprechend dem vorgestellten Kaskadenmodell erfolgt eine Destabilisierung des Grundzustandes sowie eine energetisch gestaffelte Angleichung an den Intermediatzustand. Durch diese Erweiterungen erfolgt eine Harmonisierung der Modells von ROBERTUS mit der Theorie von KOSHLAND [294].

**Die Art der zu spaltenden Bindung hat einen Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeiten** Eng verbunden mit den im vorangegangenen Abschnitt erklärten Effekten der Destabilisierung der Grundzustände und dem Angriff eines Nukleophils auf das Acylenzymintermediat ist die Umsetzung von verschiedenen Substraten. Unter Abschnitt 4.3.2 wurden hierzu die Ergebnisse der initialen Hydrolysestudien von Carbonsäurederivaten

<sup>18</sup>Eine Kaskade bezeichnet den Ablauf von Ereignissen oder Reaktionen, die sich direkt bedingen und dem energetischen Gefälle folgen [300].

diskutiert. Im Folgenden sollen die Effekte des Oxyanion-Lochs auf die Umsetzung verschiedener Substrate erläutert werden.

Zunächst führt die Betrachtung des *wt*-Trypsin zu der Annahme, dass die Substrate Bz-AARAG, Bz-R-OMe und Bz-K-OMe sowohl in ihren  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werten sehr ähnlich sind. Es entspricht dabei nicht der allgemeinen Lehrmeinung, dass vor allem die Umsetzung des Peptides mit einer ähnlich hohen Geschwindigkeit wie die des Esters stattfindet. Im Wesentlichen gehen die allgemeinen Lehrmeinungen davon aus, dass Amidbindungen schwerer angreifbar sind als Esterbindungen (siehe Abb. 4.6), wodurch die Acylierung des Trypsins bei Amidsubstraten geschwindigkeitsbestimmend ist, während bei Estersubstraten die Deacylierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt [301]. Die annähernd identischen  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte für die Substrate Bz-AARAG, Bz-R-OMe und Bz-K-OMe zeigen allerdings, dass sowohl für die Estersubstrate als auch für das Peptid die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Dieser Umstand wird in der Literatur immer wieder diskutiert. Einen Überblick dazu liefert der Übersichtsartikel von HEDSTROM [122]. Es wird gezeigt, dass Bestimmungen der Teilkonstanten nach dem Schema 3.1 für verschiedene Serinproteasen teilweise Ergebnisse liefern, die dafür sprechen, dass die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Wiederum andere Arbeiten widerlegen dies. Unbestritten ist aber, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt vor allem durch die Elektronendichte des anzugreifenden Carbonylkohlenstoff beeinflusst wird und diese maßgeblich von der Abgangsgruppe abhängt [213]. Damit ist ebenso für Ester- als auch für Peptidsubstrate prinzipiell der Deacylierungsschritt geschwindigkeitsbestimmend. Als Ausnahme können Anilide betrachtet werden, welche sehr elektronenreich sind, wie beispielsweise *para*-Methoxyanilide [213].

Die Trypsinvarianten Q192P und G193P zeigen gegenüber dem *wt*-Trypsin ein verändertes Verhalten. Zwar zeigen die Trypsinvarianten für die Substrate Z-K-SMe und Z-K-OMe noch das Verhalten des *wt*-Trypsins mit identischen Deacylierungsgeschwindigkeiten und die  $K_m$ -Werte sind für den Oxoester höher als für den Thioester, aber für die Substrate Bz-K-OMe, Bz-R-OMe und Bz-AARAG ergibt sich ein Trend, bei dem sowohl die  $K_m$ -Wert ansteigen als auch die  $k_{cat}$ -Werte absinken. Dieses Verhalten kann nicht ausschließlich auf die unterschiedlich stark angreifbaren Carbonylkohlenstoffe zurückgeführt werden, da diese für die Substrate Bz-R-OMe und Bz-K-OMe identisch sein sollten. Eine Vermutung ist, dass man das Bindeverhalten im MICHAELIS-MENTEN-Komplex durch die Mutationen im Oxyanion-Loch verändert. Dies legt auch ein Vergleich der Bindungsenergien der Substrate nahe (siehe Tab. 4.19), würde aber, wie weiter oben diskutiert, implizieren, dass ein Unterschied in den Kristallstrukturen mit Übergangszustandsanalogen Inhibitoren zu beobachten wäre.

Des Weiteren ist im Gegensatz zu den Positionen 193-195, bei welchen sowohl das Peptidrückgrat als auch die Seitenketten Teil des Oxyanion-Lochs, der katalytischen Triade oder der Trypsinstruktur sind [258], die Position 192 mit seiner Seitenkette an der Ausformung der  $S_1$ -Bindetasche beteiligt [85, 302]. Dies spricht zwar prinzipiell für einen Einfluss auf die Substratbindung durch die Prolinmutation, aber dennoch erklärt es nicht, weshalb sowohl der  $K_m$ - als auch  $k_{cat}$ -Wert beeinflusst werden und weshalb dieses Verhalten bei der Trypsinvariante G193P für die oben genannten Substrate auftritt.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die Trypsinvarianten sensitiver auf die Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff reagieren. Das ist denkbar, da durch die eingeführten Proline stabilisierende Effekte auf die Übergangszustände verlorengehen und, damit verbunden,

die Elektronendichte um den Carbonylkohlenstoff eine andere Verteilung erhält. Dabei spielt nicht nur die Abgangsgruppe eine Rolle, auch der Acylrest selbst liefert hierzu einen Beitrag [213, 303, 304]. Die verschiedenen Acylreste in den Substraten Bz-R-OMe, Bz-K-OMe und Bz-AARAG liefern, bedingt durch unterschiedliche mesomere und induktive Effekte, auch unterschiedliche Elektronendichten am Carbonylkohlenstoff, sowohl im MICHAELIS-MENTEN-Komplex als auch im Acylenzym. Vor allem im letzteren führt dies bei den Trypsinvarianten für die obengenannten Substrate zu unterschiedlichen Katalysegeschwindigkeiten. Entsprechend diesen Veränderungen kann man folgern, dass für die Trypsinvarianten eine echte Spezifitätsänderung für die Substrate erfolgt. Die Spezifität verschiebt sich von Peptidbindungen und Estern hin zu einer Spezifität für Ester unter Verlust der Spezifität für Peptidbindungen. Damit geht die Amidase-Aktivität der Protease, unter Erhalt der Esterase-Aktivität, verloren. Dieser Effekt begünstigt Acyltransferreaktionen, da nicht mehr mit Produkt- und Sekundärhydrolyse zu rechnen ist.

Eine Änderung in umgekehrter Richtung von einer Spezifität für Ester hin zu einer induzierten Amidase-Aktivität konnte von SYRÉN für die Lipase B gezeigt werden [305]. Hierzu wurde durch rationelles Design eine Wasserstoffbrückenbindung zum im Substrat befindlichen Amid-Wasserstoff eingeführt. Diese scheint zwar in erster Linie mehr der Substratdiskriminierung zu dienen, führt aber ebenfalls zu einer Reduzierung der Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff im Substrat und damit zu einer leichteren Angreifbarkeit durch den aktivierten Serin-Rest und ist als mechanistische Veränderung der Substratdiskriminierung<sup>19</sup> anzusehen.

Es bleibt festzuhalten, dass die Prolinvarianten des Oxyanion-Lochs von Trypsin aus den kinetischen Daten für die Acyltransferreaktion gegenüber dem *wt*-Trypsin bevorteilt zu sein scheinen. Obwohl der Verlust von Katalysegeschwindigkeit für eine Anwendung schwerwiegend scheint, ist dennoch die Verschiebung der Spezifität ein gutes Indiz dafür, dass die Produktausbeuten aufgrund fehlender Sekundärhydrolyse hoch sein sollten.

Ebenso bleibt festzuhalten, dass das Oxyanion-Loch prinzipiell ein lohnendes Ziel für die Optimierung von Biokatalysatoren zu sein scheint, da eine gerichtete Veränderung des Katalyse-Mechanismus durch die gezielte Veränderung einzelner Reste in diesem möglich ist.

### 4.3.5 Bestimmung des Effizienzparameters

Die bestimmten Effizienzparameter sind in Abbildungen 4.10 und 4.11 zu finden. Die bestimmten Einzelparameter befinden sich im Anhang in Tabelle C.3 und C.4. Die Effizienzparameter wurden, wie unter 3.3.4 und B.3.9 erläutert, ermittelt.

#### Acyltransfer auf Aminosäureamide

Die Bestimmung der Effizienzparameter beim Acyltransfer vom Ester Bz-R-OEt auf Aminosäureamide liefert im Wesentlichen drei Ergebnisse.

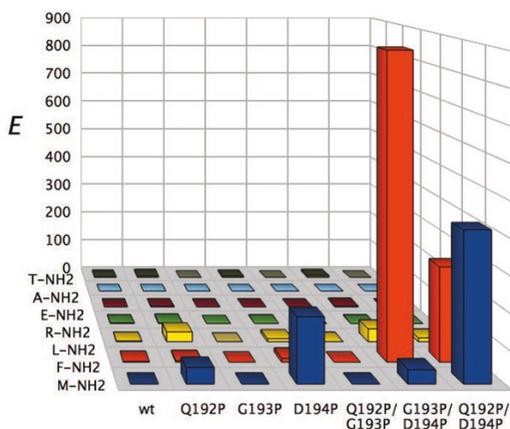
1. Die Trypsinvarianten zeigen in Analogie zum *wt*-Trypsin eine erhöhte Selektivität in S<sub>1</sub>'-Position für Methioninamid (M-NH<sub>2</sub>) bzw. für Phenylalaninamid (F-NH<sub>2</sub>), das

<sup>19</sup>In den Arbeiten von SYRÉN [305, 306] wurde gezeigt, dass Amidasen Übergangszustände durch Wasserstoffbrücken aus dem Substrat selbst stabilisieren. Dies wurde als Substrat-assistierte Wasserstoffbrücke im Übergangszustand bezeichnet.

Letztere besonders bei der Trypsinvariante G193P/D194P. Dies äußert sich durch erhöhte Aminolyseraten (vgl. Tab. C.3) gegenüber den anderen verwendeten Aminosäureamiden. Damit entsprechen die Trypsinvarianten in der  $S'_1$ -Selektivität dem *wt*-Trypsin.

2. Die Varianten G193P und Q192P/G193P sind nur bedingt in der Lage, Acyltransferreaktionen von Bz-R-OEt auf Aminosäureamide zu katalysieren und liefern entsprechend der Gleichungen unter 3.3.4 sehr kleine Werte oder Werte von Null für die Effizienz. Die geringen Effizienzen sind den geringen Aminolyseraten geschuldet (vgl. Tab. C.3). Diese Trypsinvarianten sind für Acyltransferreaktionen nicht geeignet und scheiden für die Bestimmung des Effizienzparameters in Acyltransferreaktionen auf Pentapeptide aus.

3. Die Trypsinvarianten G193P, D194P, G193P/D194P und Q192P/D194P zeigen gegenüber dem *wt*-Trypsin gesteigerte Werte in den Effizienzparametern. Die erhöhten Effizienzen der Trypsinvarianten resultieren aus verringerten Raten der Sekundärhydrolyse. Damit bedingen diese Trypsinvarianten eine erhöhte Produktstabilität und sind somit geeignete Kandidaten für Acyltransferreaktionen.



**Abbildung 4.10** Effizienzen des Acyltransfers von Aminosäureamiden auf den Ester Bz-R-OEt katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten. Bestimmt wurden die maximale Ausbeute, die Hydrolysegeschwindigkeit des Esters ( $v_{(Ester-Hydrolyse)}$ ), die Aminolysegeschwindigkeit ( $v_{(Ester-Aminolyse)}$ ) und die Geschwindigkeit der Produkthydrolyse ( $v_{(Produkt-Hydrolyse)}$ ). Aus diesen Parametern wurde die Effizienz berechnet nach:  $E = \frac{v_{Aminolyse} * \text{Maximale Ausbeute}(\%)}{v_{Produkt-Hydrolyse} * 100\%}$ . Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8; 30 °C; 2 mM Ester; 15 mM effektive Nukleophilkonzentration; Enzymkonzentration: [wt] 1,5 nM; [Q192P] 5,2 nM; [G193P] 0,52 μM; [D194P] 0,49 μM; [Q192P/G193P] 0,77 μM; [Q193P/D194P] 78 μM; [Q192P/D194P] 6,2 μM.

### Acyltransfer auf Pentapeptide

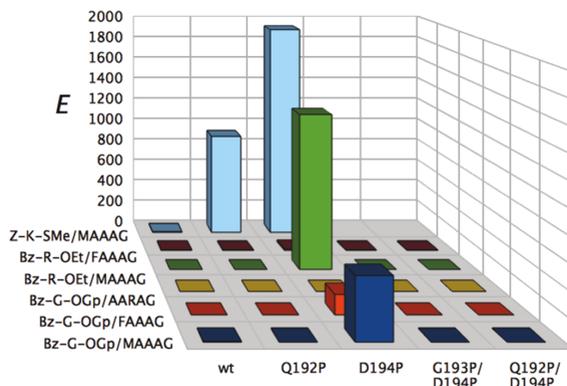
Für den Acyltransfer auf Pentapeptide wurden die Ester Bz-R-OEt und Z-K-SMe als Standardester eingesetzt. Bz-G-OGp wurde als Substratmimetikum eingesetzt. Neben diesen Acyldonoren kamen die Acylakzeptoren MAAAG, AARAG und FAAAG als Pentapeptide zum Einsatz.

Die Trypsinvarianten G193P/D194P und Q192P/D194P zeigen gegenüber dem *wt*-Trypsin bei keiner Acyldonor-Acylakzeptor-Kombination einen gesteigerten Effizienzpara-

meter. Die geringen Effizienzen im Acyltransfer sind wiederum auf die geringen Aminolyseraten zurückzuführen (vgl. Tab. C.4) und lassen diese Trypsinvarianten als geeignete Kandidaten für Acyltransferreaktionen auf Pentapeptide bzw. auf Oligopeptide ausscheiden.

Die Trypsinvarianten Q192P und D194P zeigen im Verhältnis zum *wt*-Trypsin gesteigerte Effizienzparameter, sowohl bei der Verwendung des Bz-G-OGp-Esters als auch bei der Verwendung der Standardester. Im Gegensatz zum Wiltyp erreichen die Trypsinvarianten ihre größten Effizienzparameter nicht mit Bz-G-OGp, sondern mit dem Ester Z-K-SMe. Dies ist im Wesentlichen einem leicht verbesserten Aminolyse- zu Hydrolyseverhältnisses und einer verringerten Produkthydrolyse bei der Verwendung des Z-K-SMe Esters geschuldet. Ebenso wie beim *wt*-Trypsin werden die größten Effizienzparameter mit dem Nukleophil MAAAG erreicht. Der Acylakzeptor FAAAG führt nur bedingt im System Bz-G-OGp/FAAAG mit den Trypsinvarianten zu gesteigerten Effizienzparametern gegenüber dem *wt*-Trypsin. Besonders große Effizienzparameter erreicht die Trypsinvariante D194P bei der Verwendung der Substratsysteme Bz-R-OEt/MAAAG und Z-K-SMe/MAAAG. Auch hier sind gegenüber dem *wt*-Trypsin verringerte Sekundärhydrolyseraten ausschlaggebend für die gesteigerten Effizienzparameter. Auf das Pentapeptid AARAG wird von keinem der untersuchten Trypsine der Acyldonor gegenüber dem *wt*-Trypsin besser übertragen.

Im Ergebnis kann man zusammenfassen, dass die Trypsinvarianten G193P/D194P und Q192P/D194P nicht für Acyltransferreaktionen geeignet sind. Die Trypsinvarianten Q192P und D194P zeigen gegenüber dem *wt*-Trypsin gesteigerte Effizienzparameter aufgrund der verringerten Sekundärhydrolyse und stellen damit geeignete Kandidaten für Acyltransferreaktionen dar.



**Abbildung 4.11** Effizienzen der Acyltransferreaktion von verschiedenen Estern auf Pentapeptide katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten. Bestimmt wurden die maximale Ausbeute, die Hydrolysegeschwindigkeit des Esters ( $v_{(Ester-Hydrolyse)}$ ), die Aminolysegeschwindigkeit ( $v_{(Ester-Aminolyse)}$ ) und die Geschwindigkeit der Produkthydrolyse ( $v_{(Produkt-Hydrolyse)}$ ). Aus diesen Parameter wurde die Effizienz berechnet nach:  $E = \frac{v_{Aminolyse} \cdot \text{Maximale Ausbeute}(\%)}{v_{Produkt-Hydrolyse} \cdot 100\%}$ . Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 8; 30 °C; 2 mM Ester; 15 mM effektive Nukleophilkonzentration; Enzymkonzentration: [wt] 1,5 nM; [Q192P] 5,2 nM; [D194P] 0,49  $\mu\text{M}$ ; [Q193P/D194P] 78  $\mu\text{M}$ ; [Q192P/D194P] 6,2  $\mu\text{M}$ .

Die Bestimmung der Effizienzparameter liefert indirekt Erkenntnisse über die S'<sub>1</sub>-Selektivität (vgl. Abschnitt 3.3.4) und vergleicht dabei die einzelnen Trypsinvarianten in

ihrer Effizienz einen Acylrest auf ein Nukleophil zu übertragen. Im Resultat konnten sowohl für die Effizienzparameter bei der Übertragung von Acylresten sowohl auf Aminosäureamide als auch auf Pentapeptide drei wesentliche Beobachtungen gemacht werden.

1. Die Doppelvarianten G193P/D194P und Q192P/D194P zeigen eine gesteigerte Präferenz für aromatische Aminosäuren in P<sub>1</sub>-Position, dies stimmt mit den Beobachtungen überein, die WANG [139] für die strukturellen Veränderungen, wie sie unter Abschnitt 4.2.2 diskutiert werden, gemacht hat. Diese Trypsinvarianten sind allerdings für den enzymkatalysierten Acyltransfer ebenso ungeeignet, wie die Trypsinvarianten G193P und G192P/G193P, welche nicht mehr in der Lage sind Acylreste auf Pentapeptide oder auf Pentapeptide und Aminosäureamide zu übertragen (vgl. Tab. C.3 und C.4). Die Ursachen dafür werden in Abschnitt 4.3.6 diskutiert.

2. Die Trypsinvarianten Q192P und D194P zeigen eine Präferenz, wie sie dem *wt*-Trypsin entspricht. Es werden vor allem voluminöse Aminosäuren, wie Arginin und Phenylalanin in P<sub>1</sub>-Position bevorzugt. Dennoch ist Methionin die Aminosäure mit der größten Präferenz in der S<sub>1</sub>-Bindetasche. Das entspricht den Selektivitäten für diese Position, wie sie in der Literatur für den Wiltyp zu finden sind [302, 307]. Die beobachteten hohen Effizienzparameter für diese Trypsinvarianten resultieren wiederum aus Teilkonstanten. Maßgeblich scheint jedoch nicht eine deutlich verbesserte Aminolyse- zu Hydrolyse-Rate zu sein, vielmehr ist für die hohen Effizienzparameter die verminderte Sekundärhydrolyse-Rate entscheidend.

3. Die Verwendung des Substratmimetikakonzeptes hat sich für *wt*-Trypsin, auf Grund des Verlustes der Erkennungssequenz während des Acyltransfers und der damit verbundenen Unterdrückung der Produkthydrolyse, als vorteilhaft erwiesen. Die Trypsinvarianten zeigen für die Verwendung von Standardester für den Acyltransfer ebenfalls keine Produkthydrolyse obwohl die Erkennungssequenz im Produkt erhalten bleibt. Entsprechend kann angenommen werden, dass die Trypsinvarianten bei Vorhandensein weiterer Erkennungssequenzen im Produkt keine Sekundärhydrolyseaktivität aufweisen, was als Vorteil für die Proteinmodifizierung angesehen werden kann.

### 4.3.6 Kinetische Parameter der Acyltransferreaktion

Die Ergebnisse zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Acyltransferreaktion befinden sich in Tabelle 4.27 und 4.28. Die Daten wurden, wie unter 3.3.4 beschrieben, ermittelt.

Für den Acyltransfer von Z-K-SMe, als Acyldonor, auf den Acylakzeptor M-NH<sub>2</sub>, katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten, ergeben sich Affinitätskonstanten zum Acylakzeptor zwischen 6,4 und 13,9 mM. Das *wt*-Trypsin erreicht seine halbmaximale Aminolysegeschwindigkeit bei 7,2 mM Nukleophilkonzentration. Mit 6,9 und 6,4 mM erreichen die Trypsinvarianten Q192P, D194P und Q192P/G193P ähnliche Werte. Demgegenüber erhöhen sich die  $K_N$ -Werte für die Trypsinvarianten G193P/D194P, Q192P/D194P und G193P. Für die Trypsinvariante G193P/D194 entspricht der  $K_N$ -Werte ungefähr dem des *wt*-Trypsins. Bei den Trypsinvarianten G193P und Q192P/D194P ist der  $K_N$ -Werte um den Faktor von 1,7 bzw. 1,9 erhöht.

Die Wechselzahl der Aminolyse ist beim *wt*-Trypsin 218 s<sup>-1</sup>. Alle Trypsinvarianten liegen mit ihren Wechselzahlen unter diesem Wert. Die Trypsinvariante Q192P erreicht mit 89 s<sup>-1</sup> etwas weniger als die Hälfte dieses Wertes und für die Varianten D194P, Q192P/G193P und G193P/D194P sind diese Werte um zwei bis vier Größenordnungen herabgesetzt.

**Tabelle 4.27** Bestimmung der kinetischen Konstanten der Aminolyse für die Reaktion von Z-K-SMe mit M-NH<sub>2</sub> zu Z-KM-NH<sub>2</sub> katalysiert durch die Trypsinvarianten und *wt*-Trypsin. Z-K-SMe wurde dabei in Konzentrationen eingesetzt, welche die jeweilige Trypsinvariante sättigen, d. h. bei mindestens 10 \*  $K_m$ . Es wurden unter initialen Bedingungen die entsprechenden Aminolysegeschwindigkeiten bestimmt, dabei wurde die Bildung von 10 % Produkt nicht überschritten. Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8; 30 °C; [Z-K-SMe] 5 mM und für die Trypsinvariante Q192P/G193P 20 mM; [M-NH<sub>2</sub>] 0,1-80 mM; Enzymkonzentration: [*wt*] 5,6 nM; [Q192P] 0,33 μM; [G193P] 3 μM; [D194P] 3,78 μM; [Q192P/G193P] 7,56 μM; [Q193P/D194P] 1,43 μM; [Q192P/D194P] 12,3 μM.

Enzym	$K_N$ (mM)	$k_N$ (s <sup>-1</sup> )	$k_N/K_N$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
<i>wt</i>	7,2 ± 0,9	218 ± 29	30
Q192P	6,9 ± 0,7	89,0 ± 3,5	13
G193P	14,0 ± 1,2	0,16 ± 0,01	0,011
D194P	6,4 ± 0,9	2,80 ± 0,05	0,43
Q192P/G193P	6,4 ± 0,5	0,65 ± 0,01	0,1
G193P/D194P	8,1 ± 1,4	0,02 ± 0,01	0,0025
Q192P/D194P	12,6 ± 0,8	3,50 ± 0,01	0,08

Die resultierenden Spezifitätskonstanten  $\frac{k_N}{K_N}$  spiegeln die vorangegangenen Ergebnisse zu den kinetischen Konstanten wider. So liegen diese für *wt*-Trypsin bei einem Wert von 30 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>, für Q192P bei 13 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> und für D194P bei 0,43 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>. Während für die restlichen Trypsinvarianten die  $\frac{k_N}{K_N}$ -Werte unter 0,1 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> liegen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Trypsinvarianten Q192P, D194P und Q192P/G193P eine stärkere Affinität zum Nukleophil als *wt*-Trypsin besitzen. Die Trypsinvarianten G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P hingegen zeigen eine geringere Affinität zum Nukleophil. Die Wechselzahlen der Trypsinvarianten zeigen durchgehend eine verringerte Umsatzgeschwindigkeit, welche nicht durch den  $K_N$ -Wert ausgeglichen werden kann. Resultierend aus diesem Umstand zeigen auch die Spezifitätskonstanten für den Umsatz mit einem Nukleophil bei allen Trypsinvarianten eine Verringerung gegenüber dem *wt*-Trypsin.

Die Bestimmung des Effizienzparameters hat von sechs Trypsinvarianten vier für die Protease-katalysierte Acyltransferreaktion ausgeschlossen. Für die verbleibenden zwei Trypsinvarianten Q192P und D194P kann angenommen werden, dass sie aufgrund verringerter Sekundärhydrolyse, wie unter Abschnitt 4.3.3 erläutert, besonders geeignet erscheinen. Im nächsten Abschnitt soll auf die Gründe eingegangen werden, warum die anderen Trypsinvarianten keinen effizienten Acyltransfer mehr zulassen bzw. welche Eigenschaften dazu führen, dass die Trypsinvarianten Q192P und D194P besonders geeignet scheinen.

### Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse unter sättigenden Bedingungen

Der Vergleich der maximalen Aminolysegeschwindigkeit mit der zugehörigen Hydrolysegeschwindigkeit zur Abschätzung der Acyltransferereigenschaften befindet sich in Tabelle 4.28.

Das *wt*-Trypsin weist unter Sättigung, sowohl mit Acyldonor als auch mit Acylakzeptor, die größte Aminolysegeschwindigkeit mit 35 μM\*s<sup>-1</sup> bei 10 μM\*s<sup>-1</sup> Hydrolysegeschwindigkeit auf. Daraus ergibt sich ein Quotient von 3,5 und damit Begünstigung von Aminolyse-

zur Hydrolysegeschwindigkeit. Ähnlich günstige Quotienten erreichen die Trypsinvarianten Q192P und D194P. Bei diesen Trypsinvarianten ergeben die Quotienten der Aminolysegeschwindigkeiten von 32,2 bzw. 7  $\mu\text{M}^*\text{s}^{-1}$  zu den Hydrolysegeschwindigkeiten von 10,1 bzw. 2,3  $\mu\text{M}^*\text{s}^{-1}$  Werte von 3,2 bzw. 3,0. Es ist bei diesen Trypsinvarianten mit deutlich mehr Aminolyse- als Hydrolyseprodukt zu rechnen, wenn die Reaktion von Z-K-SMe mit M-NH<sub>2</sub> unter sättigenden Bedingungen katalysiert wird.

**Tabelle 4.28** Bestimmung der maximalen Aminolysegeschwindigkeit und der dazugehörigen Hydrolysegeschwindigkeit für die Reaktion von Z-K-SMe mit M-NH<sub>2</sub> zu Z-KM-NH<sub>2</sub> katalysiert durch die Trypsinvarianten und *wt*-Trypsin. Z-K-SMe und M-NH<sub>2</sub> wurden dabei in Konzentrationen eingesetzt, welche die jeweilige Trypsinvariante sättigen, d. h. bei mindestens  $10 * K_m$  oder  $10 * K_N$ . Es wurden unter initialen Bedingungen die entsprechenden Aminolysegeschwindigkeiten bestimmt, dabei wurde eine maximale Produktbildung von 10 % nicht überschritten, mit Ausnahme der Trypsinvarianten Q192P und Q192P/G193P, bei diesen wurde die initialen Aminolysegeschwindigkeit bis 90 % der Produktbildung bestimmt. Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8; 30 °C; [Z-K-SMe] 5 mM und für die Trypsinvariante Q192P/G193P 20 mM; [M-NH<sub>2</sub>] 80 mM; Enzymkonzentration: [*wt*] 5,6 nM; [Q192P] 0,33  $\mu\text{M}$ ; [G193P] 3  $\mu\text{M}$ ; [D194P] 3,78  $\mu\text{M}$ ; [Q192P/G193P] 7,56  $\mu\text{M}$ ; [Q193P/D194P] 1,43  $\mu\text{M}$ ; [Q192P/D194P] 12,3  $\mu\text{M}$ .

Enzym	$v_{\text{Max-Aminolyse}}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$v\text{-Hydrolyse bei } v_{\text{Max-Aminolyse}}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$v_{\text{Max}}/v\text{-Hydrolyse}$
<i>wt</i>	35,0 ± 1,6	10,0 ± 0,1	3,5
Q192P	32,2 ± 1,2	10,1 ± 0,8	3,2
G193P	1,40 ± 0,04	19,0 ± 1,3	0,07
D194P	7,0 ± 0,2	2,3 ± 0,1	3
Q192P/G193P	0,50 ± 0,04	7,80 ± 0,03	0,06
G193P/D194P	0,10 ± 0,06	0,60 ± 0,04	0,17
Q192P/D194P	0,60 ± 0,02	1,20 ± 0,01	0,5

Die Trypsinvarianten G193P, Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P zeigen beim Quotient aus maximaler Aminolysegeschwindigkeit zur der entsprechenden Hydrolysegeschwindigkeit Werte von 0,06-0,17. Sie besitzen dementsprechend für die beschriebenen Reaktionen Aminolysegeschwindigkeiten, welche um einen Faktor 6-15 kleiner sind als die Hydrolysegeschwindigkeiten. Diese Trypsinvarianten eignen sich demnach nicht für Acyltransferreaktionen, da sie selbst unter sättigenden Bedingungen an Nukleophil die Hydrolysereaktion bevorzugen.

Zusammenfassend zeigen nur das *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten Q192P und D194P für die Reaktion Z-K-SMe mit M-NH<sub>2</sub> unter sättigenden Bedingungen ein günstiges Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnis. Damit stellen diese Trypsine prinzipiell geeignete Katalysatoren für die Acyltransferreaktion dar. Die Trypsinvarianten G193P, Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P zeigen unter den gegebenen Bedingungen schlechte Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse und sind damit ungeeignete Kandidaten für Acyltransferreaktionen.

Die Bestimmung der Assoziationskonstanten  $K_N$  des Nukleophils<sup>20</sup> und der Katalysegeschwindigkeiten der Deacylierung durch das Nukleophil führen zu zwei unterschiedlichen

<sup>20</sup>In diesem Abschnitt bezieht sich der Begriff Nukleophil auf Aminosäuren und Peptide.

Ergebnissen für die Trypsinvarianten. Zum einen führen die Mutationen bei den Trypsinvarianten G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P zu einer verschlechterten Affinität zum Nukleophil und die Deacylierungsgeschwindigkeit durch das Nukleophil sinkt, so dass die Deacylierung durch ein Nukleophil nicht mehr gegeben ist. Und zum anderen ist für die Trypsinvarianten Q192P, D194P und Q192P/G193P bei gleichzeitig geringeren Deacylierungsgeschwindigkeiten eine größere bzw. zumindest ähnliche Affinität wie beim *wt*-Trypsin zu beobachten.

Betrachtet man die resultierenden Spezifitätskonstanten der Enzyme für die Deacylierung durch das Nukleophil, zeigen alle Trypsinvarianten eine Verschlechterung gegenüber dem *wt*-Trypsin. Vergleicht man allerdings die Katalysegeschwindigkeiten für die Deacylierung des identischen Acyldonors mit Wasser oder einem Nukleophil, so ergibt sich, dass die Deacylierungen für die Trypsinvarianten durch Wasser schlechter verlaufen als die Deacylierungen durch das Nukleophil M-NH<sub>2</sub> (vgl. Tab. 4.3.3 und 4.27). Der Vergleich dieser Werte spiegelt dennoch nicht die wahren Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse während einer Acyltransferreaktion wider, sondern stellt den Vergleich zweier idealisierter Reaktionen dar. Für die realen Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse während einer Acyltransferreaktion unter sättigenden Bedingungen sind die Ergebnisse in Tabelle 4.28 deutlich aussagekräftiger. Es ist zu erkennen, dass die Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse nur noch für die Reaktionen, welche durch die Trypsinvarianten Q192P und D194P katalysiert werden, zu ähnlichen Verhältnissen führen, wie die Reaktion beim *wt*-Trypsin und damit ähnlich hohe Ausbeuten zu erwarten sind. Die Erklärung, warum die Trypsinvarianten G193P, Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P in der Untersuchung zu den Effizienzparametern als ungeeignet erscheinen, liegt dementsprechend in der verminderten Akzeptanz und Umsetzung der Nukleophile.

Hier stellt sich die Frage, warum diese Trypsinvarianten die Nukleophile nicht mehr akzeptieren, obwohl die Veränderung des Oxyanion-Lochs keinen Einfluss auf den S'-seitigen Bereich der Substraterkennung haben sollte. Eine Möglichkeit der Beantwortung dieser Frage bietet der Ausgangspunkt dieser Arbeit mit der Betrachtung der Thioesterase. Für dieses Enzym wurde eingangs erwähnt, dass die Mutation des Prolin 26 zu einem Glycin zu einer Verschiebung der Acyltransferreaktion hin zu einer Hydrolysereaktion führt (siehe Teil 1.2.2). Als Ursache dafür wird angeführt, dass die durch das Glycin eingeführten Freiheitsgrade gegenüber der starren Struktur des Prolin mehr Freiheiten zulassen und den Angriff von Wasser auf das Acylenzymintermediat ermöglichen [110, 118, 121]. Die Erhöhung der Freiheitsgrade im aktiven Zentrum der Thioesterase kann sicherlich als Spezialfall für die Thioesterase, mit ihren Eigenheiten der Substrateinbindung (siehe Teil 1.2.2), angesehen werden. Für Trypsin kann dennoch der umgekehrte Fall als Grund für die schlechte Angreifbarkeit des Acylenzyms durch ein Nukleophil gelten. Die verringerten Freiheitsgrade durch die Einführung der Proline schränkt die Plastizität des Oxyanion-Lochs weiter ein und lässt im Gegenzug nur noch wenig Spielraum für die ohnehin schon sterisch anspruchsvolle Reaktion der Deacylierung in Form einer S<sub>N</sub>2-Reaktion<sup>21</sup> zu, so dass die Aminolyse durch ein sterisch anspruchsvolles Nukleophil, wie es ein Peptid dargestellt, nicht mehr bevorzugt wird. In Folge der gestiegenen sterischen Ansprüche steigen die

<sup>21</sup>S<sub>N</sub>2-Reaktion ist eine bimolekulare, nukleophile Substitutionsreaktion bei der Bindungsbruch und -bildung konzertiert erfolgen. Der durchlaufene Übergangszustand stellt ein Gebilde hohen Ordnungsgrades dar, dessen Bildung hohe sterische Anforderungen stellt [308].

$K_N$ -Werte und die  $k_N$ -Werte fallen. Somit ist die Aminolyse für die Trypsinvarianten G193P, Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P praktisch zu vernachlässigen.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass in Verbindung mit der stereoelektronischen Kontrolle der Katalyse ebenfalls ein Einfluss durch den Rest 193 unter Berücksichtigung der Inversion des Amidstickstoffs in der zu spaltenden Peptidbindung denkbar ist. Hierbei wird angenommen, dass das freie Elektronenpaar des Amidstickstoffs, während der Acylierung des Enzyms, in periplanarer Stellung zum Kohlenstoff stehen muss, damit das Serin 195 den Carbonylkohlenstoff angreifen kann, aber in antiperiplanarer Konfiguration stehen muss, damit ein Bindungsbruch zwischen Kohlenstoff und Stickstoff erfolgen kann. Um diesen Zustand zu erreichen, muss eine Inversion am Amidstickstoff beim Durchlaufen der Übergangszustände erfolgen [309, 310]. Dies gilt ebenfalls für die Aminolyse des Acylenzyms hin zum Acyltransferprodukt. Die Ergebnisse für die Variante G193P und die Doppelvarianten würden mit einem veränderten Verhalten während der Inversion am Amidstickstoff erklärbar sein, da sowohl die Hydrolyse für peptidische Substrate gegenüber Estern deutlich herabgesetzt ist und die Aminolyse des Acylenzyms deutlich schlechter verläuft. Hierfür muss angenommen werden, dass die Wasserstoffbrücke, welche vom Amidstickstoff des Peptidrückrates in Position G193 ausgeht, einen koordinierenden Effekt auf die Inversion am Amidstickstoff der Spaltstelle im Substrat haben muss, neben dem stabilisierenden Effekt auf das Oxyanion. Um dies zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig.

### Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse unter nicht sättigenden Bedingungen

Die Ergebnisse für die Reaktion von Abz-AAK-OMe mit MAAAG zu Abz-AAK-MAAAG katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten Q192P und D194P sind in Tabelle 4.29 zu finden.

Das Verhältnis von der für diese Reaktion maximalen Aminolysegeschwindigkeit zur maximalen Hydrolysegeschwindigkeit für *wt*-Trypsin beträgt 0,02. Das heißt, dass theoretisch, unter idealen Bedingungen eine vollständige Umsetzung des Nucleophils bei 50fachem Überschuss an Acyldonor möglich ist. Die Trypsinvariante Q192P zeigt für die gleiche Reaktion einen Quotienten von 0,04 und die Trypsinvariante D194P von 0,1. Für diese Trypsinvarianten ergibt sich damit ein theoretisches Verhältnis von einem 25fachen bzw. 10fachen Überschuss an Acyldonor gegenüber dem Acylakzeptor, um die vollständige Umsetzung des Nucleophils zu erreichen. Damit zeigen die Trypsinvarianten unter Bedingungen, bei denen die Nucleophilkonzentration limitierend ist, eine Verbesserung im Verhältnis von Aminolyse zu Hydrolyse und stellen damit eine Verbesserung im Bezug auf die Acyltransferreaktion gegenüber dem *wt*-Trypsin dar.

Während die Acyltransferreaktionen unter sättigenden Bedingungen in den Verhältnissen zwischen Aminolyse und Hydrolyse für die Trypsinvarianten Q192P und D194P nur dem *wt*-Trypsin ähnliche Verhältnisse liefern, verändert sich dieses Verhalten unter nicht sättigenden Bedingungen, bei denen Nucleophil im Unterschuss vorhanden ist, zu Gunsten der Trypsinvarianten (siehe Tab. 4.29). Interessanterweise steigen dabei die Aminolyse- zu Hydrolyse-Raten um den Faktor 2 bis 5 im Vergleich zum *wt*-Trypsin. Eine Erklärung dafür kann in der Kombination aus erhöhter Affinität zum Nucleophil und der geringeren Deacylierungsgeschwindigkeit durch Wasser gesucht werden.

Diese Voruntersuchungen für eine Acyltransferreaktion mit einem Protein als Nucleophil sind vielversprechend, da vor allem die Modifizierung eines Proteins aufgrund von Löslichkeits- und Aggregations-Problemen in der Konzentration limitiert sind. Des Weiteren

**Tabelle 4.29** Bestimmung der maximalen Aminolyserate unter nicht sättigenden Bedingungen für die Reaktion von Abz-AAK-OMe mit MAAAG zu Abz-AAK-MAAAG katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten Q192P und D194P. MAAAG wurde bei einer konstanten Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Abz-AAK-OMe wurde in Konzentrationen zwischen 0,1-20 mM eingesetzt. Es wurden unter initialen Bedingungen die entsprechenden Aminolysegeschwindigkeiten bestimmt, dabei wurde eine maximale Produktbildung von 10 % nicht überschritten. Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 8; 30 °C; [Abz-AAK-OMe] 0,1-20 mM; [MAAAG-NH<sub>2</sub>] 0,2 mM; Enzymkonzentration: [*wt*] 1,6 nM; [Q192P] 0,13  $\mu\text{M}$ ; [D194P] 1,78  $\mu\text{M}$ .

Enzym	$v_{\text{Max-Aminolyse}}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$v_{\text{Max-Hydrolyse}}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$v_{\text{Max}}/v_{\text{Max-Hydrolyse}}$
<i>wt</i>	0,24 $\pm$ 0,03	11,0 $\pm$ 0,6	0,02
Q192P	2,60 $\pm$ 0,18	63,0 $\pm$ 3,1	0,04
D194P	0,23 $\pm$ 0,01	2,2 $\pm$ 0,1	0,1

zeigt diese Untersuchung an, dass bei konstanten Anteilen an Nukleophil im Wesentlichen weniger Acyldonor eingesetzt werden muss, um sich einem vollständigen Umsatz des Nukleophils anzunähern. Diese Untersuchungen bestätigen die Vermutungen aus Abschnitt 4.3.3, dass zumindest die Trypsinvarianten Q192P und D194P besser für Acyltransferreaktionen geeignet sind als *wt*-Trypsin.

### Sekundärhydrolyse

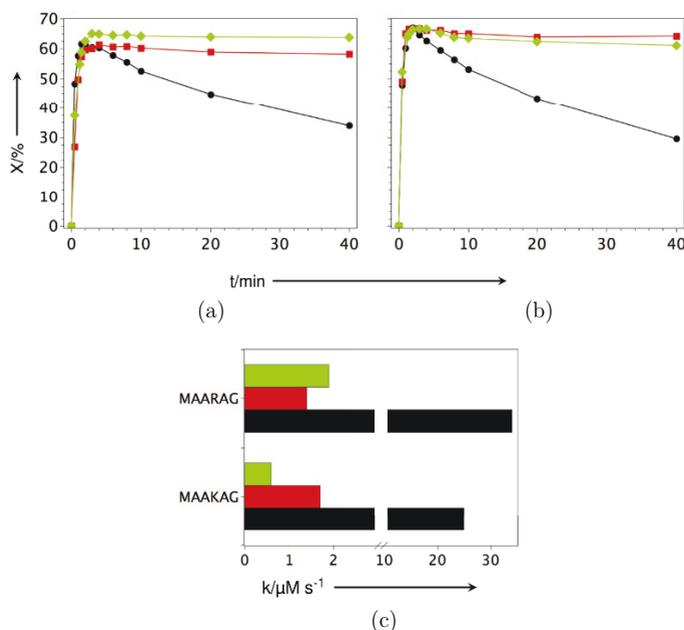
Die Geschwindigkeiten der Sekundärhydrolyse als dritter essentieller Bestandteil der Acyltransferreaktion (vgl. Abschnitt 3.3.4) sind in Abbildung 4.12 zusammengefasst.

Die aufgeführten Acyltransferreaktionen erreichten mit angeglichenen Reaktionsgeschwindigkeiten für alle Substrat-Enzym-Kombinationen Ausbeuten von 62-67 % an Acyltransferprodukt. Die beobachteten Geschwindigkeiten der Sekundärhydrolyse des jeweils gebildeten Peptidprodukts liegen beim *wt*-Trypsin zwischen 25  $\mu\text{M}^*\text{s}^{-1}$  für den Acyltransfer auf MAAKAG und 33  $\mu\text{M}^*\text{s}^{-1}$  auf MAARAG. Die Trypsinvariante Q192P zeigt demgegenüber Sekundärhydrolysegeschwindigkeiten zwischen 1,7 und 1,4  $\mu\text{M}^*\text{s}^{-1}$ . Diese sind im Vergleich zum *wt*-Trypsin um den Faktor 14-23 verringert. Ebenso zeigt die Trypsinvariante D194P mit Geschwindigkeiten von 0,55 bis 1,9  $\mu\text{M}^*\text{s}^{-1}$  eine deutliche Verringerung der Sekundärhydrolysegeschwindigkeiten. Gegenüber dem *wt*-Trypsin entspricht das einer Verringerung der Sekundärhydrolysegeschwindigkeiten um einen Faktor von 17-47.

Resultierend zeigen die Trypsinvarianten Q192P und D194P in alle getesteten Fällen eine deutliche Verringerung der Sekundärhydrolyse und somit einen signifikant verringerten Produktabbau im Verhältnis zur durch *wt*-Trypsin katalysierten Reaktion.

Ebenso, wie die Untersuchungen zu den Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnissen unter nicht sättigen Bedingungen, ergeben die Studien zur Sekundärhydrolyse gegenüber dem *wt*-Trypsin eine signifikante Verringerung und damit eine besondere Eignung für die Modifizierung von Proteinen. Dieses Verhalten resultiert aus den veränderten Substratspezifitäten der Trypsinvarianten. Verbunden mit der Änderung in der Substratspezifität können die Trypsinvarianten zwischen Ester- und Peptid-Substraten stärker diskriminieren. Es ergibt sich, dass die Trypsinvarianten ähnlich dem Substratmimetikakonzept zwischen

Edukt und Produkt unterscheiden und in der Folge eine höhere Produktstabilität entsteht. Anders als beim Substratmimetikakonzept geht dabei allerdings nicht die Spezifität für das Produkt durch den Verlust der selektivitätsdeterminierenden Esterabgangsgruppe verloren [64, 70–74] (siehe Teil 1.2.2), sondern durch den Wechsel von Esterbindung hin zur Peptidbindung. Folglich ergibt sich für die Anwendung dieser Trypsinvarianten gegenüber dem Substratmimetikakonzept ein weiterer Vorteil indem eine Hydrolysereaktion innerhalb der Produktsequenz durch weitere sekundäre Schnittstellen ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 4.12** Zeitverlauf der Acyltransferreaktion von Abz-AAK-OMe auf MAAKAG (a) und MAARAG (b), sowie der Geschwindigkeiten des unerwünschten Abbaus der resultierenden Nonapeptide (c) durch *wt*-Trypsin, Trypsin Q192P und D194P. Legend: ● *wt*; ■ Q192P; ◆ D194P. Bedingungen: Puffer: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,8; 30 °C; Acyldonor: 2 mM Abz-AAK-OMe; Acylakzeptor: 15 mM MAAKAG oder MAARAG; eingesetzte Enzymkonzentration: [*wt*] 5,6 nM; [Q192P] 0,5  $\mu\text{M}$  und [D194P] 16  $\mu\text{M}$ . Die Kinetiken wurden doppelt bestimmt und wiesen einen Fehler von unter 5 % auf.

Die Vorteile, die die Trypsinvarianten Q192P und D194P hinsichtlich der Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnis und der Sekundärhydrolyse gegenüber dem *wt*-Trypsin zeigen, sind zum einen gesteigerte Aminolyseraten gegenüber der Hydrolyse unter nicht sättigenden Bedingungen und zum anderen eine deutlich reduzierte Sekundärhydrolyse gegenüber dem gebildeten Produkt.

Die Verwendung der in dieser Arbeit untersuchten Trypsinvarianten scheint für die N-terminale Modifizierung praktikabel zu sein und soll im nächsten Abschnitt betrachtet werden.

### 4.3.7 Proteinmodifizierung

Für die Proteinmodifizierung wurde als Nukleophil Parvulin 10 eingesetzt. Entsprechend der Ergebnisse der Acyltransferexperimente (siehe 4.3.5) wurde dabei die Peptidsequenz N-Terminal um Methionin und Alanin erweitert. Die sich ergebenden Aminosäuresequenzen der verschiedenen Parvulin 10-Modifizierungen befinden sich in Abbildung C.3. Das MA-Parvulin 10 konnte mit Hilfe des pET26a-Vektors und der belB-Sequenz in BL21-Zellen periplasmatisch exprimiert und erfolgreich gereinigt werden. Massenspektren des gereinigten MA-Parvulin 10 sind im Anhang (Abbildung C.6) zu finden.

Die Modifizierung des MA-Parvulin 10 erfolgte mit den Estern 5/6-FAM-AAK-SMe und Abz-AAK-OME. Die Kinetiken der Reaktion katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten Q192P und D194P sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Die Reaktionen finden in Abwesenheit der Katalysatoren nicht statt. *Wt*-Trypsin katalysiert prinzipiell die Reaktion und erreicht für Abz-AAK-OME 11 % bzw. für 5/6-FAM-AAK-SMe 12 % Produktausbeute. In beiden Fällen ist das entstehende, modifizierte Parvulin 10 nicht stabil, d. h. es wird im zeitlichen Verlauf wieder sekundärhydrolytisch gespalten. Dies erfolgt in der ablaufenden Acyltransferreaktionen mit einer Geschwindigkeit von 3,6 bzw. 3,7  $\mu\text{M}^*\text{s}^{-1}$ .

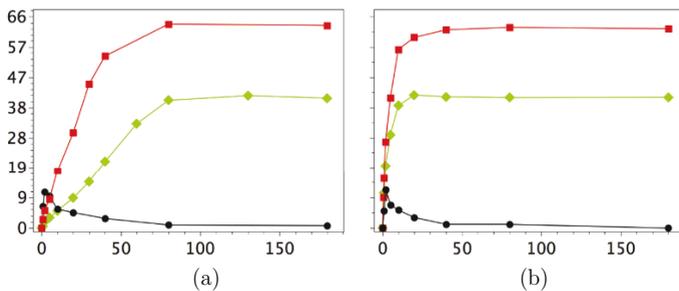
Die Trypsinvariante Q192P erreicht einen Anteil von modifiziertem Parvulin 10 von 63 bzw. 65 %, das entspricht einer Erhöhung der Ausbeute um einen Faktor 6 gegenüber dem *wt*-Trypsin. Neben der Erhöhung der Ausbeute ist die unerwünschte Sekundärhydrolyse für das Produkt bei der Trypsinvariante Q192P um einen Faktor von 180 erniedrigt.

Die Trypsinvariante D194P erreicht bei den entsprechenden Acyltransferreaktionen Ausbeuten um 41 %. Dies ist eine Erhöhung gegenüber dem *wt*-Trypsin um den Faktor 4. Gegenüber der Modifizierungsreaktion durch die Trypsinvariante Q192P stellt es aber eine Erniedrigung der Ausbeuten um den Faktor 1,5 dar. Beiden Modifizierungen mit der Trypsinvariante D194P sind die Sekundärhydrolyseraten im Vergleich zum *wt*-Trypsin um den Faktor 500 bis 1200 verringert und im Vergleich zur Variante Q192P um den Faktor 3 bis 6 verringert. Somit konnten für die Trypsinvariante D194P neben geringerer Ausbeuten auch eine deutliche Minderung der Produkthydrolyse nachgewiesen werden. Die verringerte Hydrolyse des modifizierten Parvulin 10 stellt dabei eine besondere Eignung der verwendeten Trypsinvarianten dar, da das verwendete Parvulin 10 mit 10 Lysinen und 3 Argininen 13 potentielle Schnittstellen (vgl. Aminosäuresequenz von Parvulin 10 C.3) für die Protease Trypsin besitzt.

Die Kontrolle der Acyltransferreaktion von 5/6-FAM-AAK-SMe mit MA-Parvulin 10 katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten Q192P und D194P erfolgte mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe Abb. 4.14). Die nicht katalysierte Reaktion führt zu keinem Fluoreszenzsignal auf Laufhöhe des Parvulin 10, damit ist sowohl eine Spontanreaktion zu 5/6-FAM-AAK-MA-Parvulin 10 als auch eine unspezifische Anlagerung des fluoreszenzmarkierten Acyldonors an das Parvulin 10 ausgeschlossen. Die Reaktion katalysiert durch *wt*-Trypsin führt zu keinem signifikanten Fluoreszenzsignal. Dennoch zeigt die Coomassie-Färbung die Bildung von Doppelbanden, was auf eine Degradation des Parvulin 10 schließen lässt.

Durch die Trypsinvarianten Q192P und D194P kommt es zu einem Fluoreszenzsignal auf Laufhöhe des Parvulin 10, somit kann von der Bildung des Acyltransferproduktes 5/6-FAM-AAK-MA-Parvulin 10 ausgegangen werden. Dieses Signal verliert im Fortgang der Reaktion nicht an Intensität, so dass ein Abbau des Produkts als nicht gegeben

erscheint. Ebenso ist in der Coomassie-Färbung keine Degradation des Parvulin 10 zu beobachten, was ebenfalls einen proteolytischen Abbau ausschließt.

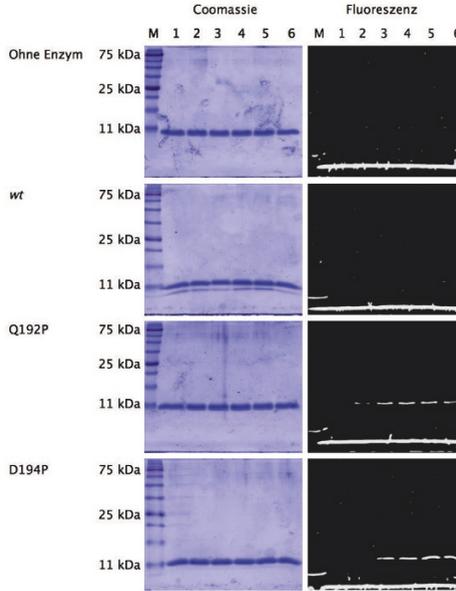


Enzym	Acylldonor	Sekundärhydrolyse	maximale Ausbeute
		( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	(%)
ohne Enzym	(a)	0	0
	(b)	0	0
<i>wt</i>	(a)	3,6	11
	(b)	3,7	12
Q192P	(a)	0,02	63
	(b)	0,02	65
D194P	(a)	0,007	41
	(b)	0,003	42

(c)

**Abbildung 4.13** Zeitverläufe zur Acyltransferreaktion von Abz-AAK-OME (a) und 5/6-FAM-AAK-SMe (b) auf MA-Parvulin 10 und den zugehörigen Teilkonstanten (c). Legend: ● *wt*; ■ Q192P; ◆ D194P. Bedingungen: Puffer: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,8; 30 °C; Acylakzeptor: 200  $\mu\text{M}$  MAParvulin 10; Acylldonor: 20 mM; eingesetzte Enzymkonzentration: [ohne Enzym] 0  $\mu\text{M}$ ; [*wt*] 5,6 nM; [Q192P] 0,5  $\mu\text{M}$  und [D194P] 16  $\mu\text{M}$ ; b) Acylldonor: 20 mM 5/6-FAM-AAK-SMe; eingesetzte Enzymkonzentration: [ohne Enzym] 0  $\mu\text{M}$ ; [*wt*] 20 nM; [Q192P] 0,87  $\mu\text{M}$  und [D194P] 20  $\mu\text{M}$ .

Die Parvuline: MA-Par10, Abz-AAK-MA-Par10 und 5/6-FAM-AAK-MA-Par10 lassen sich mittels RP-HPLC im semipräparativen Massstab trennen und anschließend lyophilisieren. Durch Resolubilisierung erhält man Parvulin 10-Derivate, welche näher untersucht wurden. Die erhaltenen Massenspektren und die für diese Parvuline bestimmten Aktivitäten befinden sich im Anhang in Abbildung C.6 und C.9. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen darauf schließen, dass sowohl korrekt modifizierte Parvuline erhalten werden, als auch, dass diese Parvuline Aktivitäten besitzen und somit die strukturelle und funktionale Integrität der Parvuline bei der Modifizierung mit den Trypsinvarianten gewahrt bleibt.



**Abbildung 4.14** Untersuchung zur Modifizierung von MA-Parvulin 10 mit 5/6-FAM-AAK-SMe. MA-Parvulin wurde hierzu mit 5/6-FAM-AAK-SMe ohne Trypsin (ohne Enzym), mit *wt*-Trypsin (*wt*), der Trypsinvariante Q192P und D194P inkubiert. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 180 min genommen. Die Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Es erfolgte eine Trennung durch SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzdetektion (Fluoreszenz) und Coomassie-Färbung (Coomassie). Die erwarteten Größen der Proteine betragen: MA-Parvulin 10 10,1 kDa, 5/6-FAM-AAKMA-Parvulin 10 10,9 kDa und Trypsin mit ca. 24 kDa. 5/6-FAM-AAK-SMe und 5/6-FAM-AAK befinden sich in der Lauffront. Bedingungen: Puffer: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; pH 7,8; 30 °C; Acyldonor: 20 mM 5/6-FAM-AAK-SMe; Acylakzeptor: 0,5 mM MA-Parvulin 10; eingesetzte Enzymkonzentration: [ohne Enzym] 0 µM; [*wt*] 20 nM; [Q192P] 0,87 µM und [D194P] 20 µM. Legende: M - Molekülmassenstandard; 1 - 0 min; 2 - 10 min; 3 - 20 min; 4 - 40 min; 5 - 80 min; 6 - 180 min. Die SDS-PAGE erfolgte in einem 17,5 %igem Gel. Das Fluoreszenzsignal wurde an einem Image Quant Typhoon im Carboxyfluoresceinkanale detektiert und das erhaltene Bild mit ImageJ 1.45s bearbeitet. Die SDS-Gele wurde im Anschluss mit Coomassie gefärbt.

### Zusammenfassung der Ergebnisse der Proteinmodifizierung:

Die *N*-terminal Modifizierung von MA-Parvulin 10 mit Abz-AAK-OMe und 5/6-FAM-AAK-SMe katalysiert durch die Trypsinvarianten Q192P und D194P konnte erfolgreich gezeigt werden. Gegenüber der Modifizierungsreaktion mit dem *wt*-Trypsin ergeben sich deutlich gesteigerte Produktausbeuten und eine signifikant verringerte Abbaurrate des modifizierten Produktes. Als besonders vorteilhaft kann die Reduktion der Sekundärhydrolyse betrachtet werden. Dies bietet einen effizienten Schutz vor proteolytischem Verdau als Nebenreaktion im Verlauf der Modifizierungsreaktion mit Hilfe der reversen Proteolyse. Die Effizienz dieses Schutzes stellt sich besonders eindrucksvoll dar, da das modifizierte Parvulin 10 mit 13 potentiellen Schnittstellen für Trypsin nach der Modifizierungsreaktion isoliert und dessen Aktivität bestimmt werden konnte. Die modifizierten Parvuline

erreichen dabei  $k_{cat}/K_M$ -Werten von  $6,37 \cdot 10^5$  und  $9,5 \cdot 10^5 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  und das unmodifizierte Parvulin von  $2,2 \cdot 10^6 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (siehe Abbildung C.9).

Mit den Trypsinvarianten Q192P und D194P ist es gelungen, zwei Trypsinvarianten bereitzustellen, welche für die *N*-terminale Proteinmodifizierung geeignet sind.

### 4.3.8 Vor- und Nachteile gegenüber anderen Modifizierungsreaktionen

Eine anwendungsbezogene Einordnung der Modifizierungsreaktionen durch die Trypsinvarianten legt zwei wesentliche Nachteile offen.

1. Die Ausbeuten, die mit dem Substratmimetikakzept in Verbindung mit der Trypsinvariante Tn K60E/N143H/E151H/D189K [78] erreicht werden, wurden mit den in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen nicht gezeigt. Vergleicht man das Substratmimetikakzept für ein System mit einer *wt*-Protease, so erreichen die Trypsinvarianten Q192P und D194P vergleichbare Ausbeuten an Acyltransferprodukt mit Standardestern [64, 81, 204, 311]. Folglich sollten die synthetisch einfacher zu realisierenden Methyl- und Ethyl-Ester bzw. deren Thioesteranaloge gegenüber den Substratmimetika-Estern wirtschaftlich einen Vorteil im Hinblick auf eine Anwendbarkeit bieten [24, 275, 312]. Des Weiteren führt die Kombination aus Substratmimetikakzept und *wt*-Protease für Proteinmodifizierungen zu keinen vergleichbaren Ausbeuten im Vergleich zu den hier gezeigten Ergebnissen der Proteinmodifizierung mit den Trypsinvarianten Q192P und D194P.

Unter der Annahme, dass das hier vorgestellte Konzept uneingeschränkt auf andere Serinesterasen übertragen werden kann, ergibt sich ebenfalls ein sehr weites Substratspektrum für eine Vielzahl von Serinproteasen. Ebenfalls ergibt sich aus der Erweiterung des hier vorgestellten Konzepts auf andere Serinproteasen die Möglichkeit Proteasen zu finden, welche eine erhöhte Affinität zum Acylakzeptor aufweisen. Damit besteht theoretisch die Möglichkeit die Produktausbeuten weiter zu steigern.

Es ist ebenfalls zu erwähnen, dass die verringerte Sekundärhydrolyse einen signifikanten Einfluss für eine Anwendung hat. Bei allen kinetisch kontrollierten Proteasen durchläuft die Akkumulation an Acyltransferprodukt ein Maximum, woraus sich die Notwendigkeit ergibt den Reaktionsverlauf genau zu kennen [36, 54], um den Zeitpunkt maximaler Produktausbeute zu erfassen. Diese Notwendigkeit entfällt bei den Trypsinvarianten Q192P und D194P, da nur sehr geringe Produktanreicherung beobachtet werden konnte und somit nach Verbrauch des Acyldonors die Reaktion abgeschlossen ist.

2. Der zweite Nachteil, der sich ergibt, ist die Notwendigkeit von einem Ester als Acyldonor auszugehen. Die Verwendung von peptidischen Acyldonoren scheint aufgrund der geringen beobachteten Acylierungsgeschwindigkeiten des Trypsins selbst nicht von Vorteil zu sein. Damit sind *C*-terminale Modifizierungen mit Acyltransferreaktionen, wie sie durch die Sortase katalysiert werden, nicht mehr denkbar [103, 313, 314]. Um *C*-terminal zu modifizierende Konstrukte zu erzeugen, bietet sich nur der Umweg über die Intein-vermittelte Synthese eines Esters an [24, 28, 315]. Womit sich allerdings eine größere Sequenzunabhängigkeit ergibt als es bei der Sortase-vermittelten Acyltransferreaktion möglich ist.

Gegenüber der Thioesterase zeigen die Trypsinvarianten Vorteile hinsichtlich der akzeptierten Substrate. Während mit der Thioesterase nur Peptidligationen und Cyclisierungen möglich sind [94, 109, 115], können mit den Trypsinvarianten auch größere Substrate,

wie das Parvulin 10 umgesetzt werden. Damit unterliegen die Trypsinvarianten Q192P und D194P nicht den Substrat-Limitationen der Thioesterase und erlauben ein größeres Spektrum an Substraten und damit ebenfalls ein größeres Spektrum an Ligationsprodukten.



## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, das Oxyanion-Loch von *wt*-Trypsin nach dem Modell der Thioesterase zu verändern. Die resultierenden Trypsinvarianten Q192P, G193P, D194P, Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P sollten daraufhin untersucht werden, ob sich durch die Veränderungen Trypsin von einer Protease in eine Transferase umwandeln lässt, welche für synthetische Zwecke verwendbar ist. Die gemachten Erkenntnisse lassen sich in drei Bereiche unterteilen: mechanistisch, synthetisch und Limitationen, welche im Folgenden zusammengefasst werden.

**Mechanistisch:** Mechanistische Erkenntnisse beschränken sich auf die Wirkweise des Oxyanion-Lochs.

1. Die Acylierung wird durch das Oxyanion-Loch weniger beeinflusst als die Deacylierung, was im Wesentlichen auf die Bildung des Alkoholats, als starkes Nukleophil, am Serin 195 während der Acylierung zurückgeführt werden kann, im Deacylierungsschritt steht dagegen das schwache Nukleophil Wasser zur Verfügung. Dadurch entsteht die Möglichkeit durch Manipulation des Oxyanion-Lochs selektiv Einfluss auf die Deacylierung zu nehmen (siehe 4.3.4).
2. Das Oxyanion-Loch stabilisiert nicht nur die Oxyanionen, sondern hilft unter Verwendung einer Wasserstoffbrücken-Kaskade den Zustand des Oxyanions zu erreichen. Über den Einfluss einzelner Positionen lässt sich diese Kaskade ebenfalls manipulieren (siehe 4.3.4).
3. Aus der selektiven Entfernung einzelner Wasserstoffbrücken der Kaskade ergibt sich eine Spezifitätsänderung, in deren Folge sich die Spezifität der Protease Trypsin hin zu einer Esterase verschiebt (siehe 4.3.4).

Die hier gefundenen Erkenntnisse helfen die Funktion des Oxyanion-Lochs weiter aufzuklären und deuten darauf hin, dass die Veränderung des Oxyanion-Lochs zu einer Veränderung der katalytischen Fähigkeiten eines Proteins beitragen kann. Obwohl sich der Bereich des Proteindesigns für Proteasen in den letzten Jahrzehnten im Wesentlichen auf die Selektivität und Substraterkennung beschränkt hat, scheint auch das Oxyanion-Loch ein prinzipiell lohnendes Ziel solcher Veränderungen zu sein.

**Synthetisch:**

1. Die Trypsinvarianten G193P, Q192P/G193P, G193P/D194P und Q192P/D194P sind für enzymatische Ligationsverfahren nicht geeignet, da die Akzeptanz für peptidische Nukleophile verloren geht.
2. Die Trypsinvarianten Q192P und D194P zeigen eine deutliche Reduktion der Sekundärhydrolyse.
3. Die Modifizierung von Proteinen mit den Trypsinvarianten Q192P und D194P ist möglich.

Entgegen der Vermutung, dass sich durch die Übertragung des Oxyanion-Lochs aus der Thioesterase eine Verbesserung der Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse ergibt, verändern sich diese Verhältnisse für die Trypsinvarianten nur unmerklich. Dennoch sind besonders die Trypsinvarianten Q192P und D194P für die Synthese wertvoll, was sich in der *N*-terminalen Proteinmodifizierung widerspiegelt. Diese Trypsinvarianten weisen eine stark verringerte Sekundärhydrolyse auf und erlauben es Modifizierungen durchzuführen ohne proteolytische Nebenreaktion befürchten zu müssen. Des Weiteren bieten sie gegenüber dem Substratmimetikakonzept den Vorteil, dass die Esterabgangsgruppe keine Selektivität vermitteln muss. Für eine wirtschaftliche Anwendung können demnach leicht zugängliche und stabile Ester verwendet werden, die beispielsweise aus einfachen Alkoholen abgeleitet werden können.

**Limitationen:** Ausgehend von Reaktionen, wie sie durch die Sortase katalysiert werden, ist eine Anwendung der hier vorgestellten Trypsinvarianten mit einem Peptid als Acyldonor nicht mehr möglich. Dies stellt einen prinzipiellen Nachteil dar, da für die Anwendung der Varianten als Katalysator bei einer Segmentkondensation zusätzlicher synthetischer Aufwand, etwa in Form einer Veresterung des *N*-terminalen Fragments, erforderlich wäre.

Der Verlauf der Reaktionen, die durch Trypsin katalysiert werden, entspricht der einer bimolekularen nukleophilen Substitution ( $S_N2$ ). Entsprechend hoch ist der Einfluss der Konzentrationen der Reaktanten. Um zumindest partiell hohe Konzentrationen im katalytischen Zentrum von Trypsin zu erzeugen, sollten die Affinitäten zu den Substraten sehr hoch sein. Während die Affinität zum Acyldonor sehr hoch ist, ist die Affinität vor allem in der natürlichen Funktion von Trypsin zum Acylakzeptor niedriger. Um dennoch sehr hohe Ausbeuten an Acyltransferprodukt zu erhalten, müssen höhere Konzentrationen an Nukleophil eingesetzt werden. Es wäre aus wirtschaftlicher Sicht daher sinnvoll, die Affinität des Katalysators zum Nukleophil zu steigern. Hierfür bieten sich zwei Möglichkeiten: Zum einen die Suche nach Serinproteasen, die in ihrer Primärspezifität hohe Affinitäten im  $S'$ -seitigen Bereich der Substratbindungsregion aufweisen, und zum anderen die Generierung von Serinproteasen mit hoher  $S'$ -seitiger Affinität. Die Affinität sollte dabei vor allem über das Peptidrückgrat im Substrat vermittelt werden, um eine geringe Sequenzabhängigkeit zu erhalten.

Die Trypsinvarianten D189K/K60E, N143H/E151H und K60E/N143H/E151H/D189K, welche in der Arbeitsgruppe vorhanden sind, weisen eine Verschiebung der Affinität in den  $S'$ -seitigen Bereich der Substratbindung auf. Eine Kombination der in dieser Arbeit erfolgreich für die Proteinmodifizierung eingesetzten Trypsinvarianten Q192P und D194P und den zuvor genannten Trypsinvarianten scheint daher vielversprechend, da die Verbindung aus hoher Affinität zum Nukleophil und geringer Peptidhydrolyseaktivität zu hohen Produktausbeuten in der Acyltransferreaktion führen sollte, bei geringem oder fehlendem Produktabbau.

# Literaturverzeichnis

- [1] *RCSB Protein Data Bank*. <http://www.pdb.org/pdb/statistics/holdings.do>, 23. Februar 2016
- [2] *Brenda Enzyme Database*. <http://www.brenda-enzymes.info/news.php>, Juli 2015
- [3] SPIRIN, A ; SIEKEVITZ, P (Hrsg.): *Ribosomes*. Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 1999
- [4] FREIDINGER, R: Using the ribosome to synthesize peptidomimetics. In: *F1000 Biology Reports* 1 (2009), Jul, Nr. 53
- [5] MEAGHER, R ; TAIT, R ; RICHARD, B ; BETLACH, M ; BOYER, H: Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. In: *Cell* (1977), Jan
- [6] STORDEUR, C ; DALLÛGE, R ; BIRKENMEIER, O ; WIENK, H ; RUDOLPH, R ; LANGE, C ; LÛCKE, C: The NMR solution structure of the artificial protein M7 matches the computationally designed model. In: *Proteins* 72 (2008), Aug, Nr. 3, S. 1104–1107
- [7] NOREN, C ; ANTHONY-CAHILL, S ; GRIFFITH, M ; SCHULTZ, P: A general-method for site-specific incorporation of unnatural amino-acids into proteins. In: *Science* 244 (1989), Jan, Nr. 4901, S. 182–188
- [8] WANG, L ; BROCK, A ; SCHULTZ, P: Adding L-3-(2-naphthyl)alanine to the genetic code of *E. coli*. In: *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002), Jan, Nr. 9, S. 1836–1837
- [9] WANG, L ; BROCK, A ; HERBERICH, B ; SCHULTZ, P: Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. In: *Science* 292 (2001), Jan, Nr. 5516, S. 498–500
- [10] CHIN, J ; CROPP, T ; ANDERSON, J ; MUKHERJI, M ; ZHANG, Z ; SCHULTZ, P: An expanded eukaryotic genetic code. In: *Science* 301 (2003), Jan, Nr. 5635, S. 964–967
- [11] BUDISA, N ; MINKS, C ; ALEFELDER, S ; WENGER, W ; DONG, F ; MORODER, L ; HUBER, R: Toward the experimental codon reassignment *in vivo*: protein building with an expanded amino acid repertoire. In: *FASEB* 13 (1999), Jan, Nr. 1, S. 41–51
- [12] WANG, L ; SCHULTZ, P: Expanding the genetic code. In: *Angewandte Chemie International Edition in English* 44 (2005), Nr. 1, S. 34–66
- [13] MERRIFIELD, R: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. In: *Journal of the American Chemical Society* 85 (1963), Jan, S. 2149–2154
- [14] CHERSI, A ; GIOMMI, S ; ROSANÒ, L: Selective 'in synthesis' labeling of peptides with biotin and rhodamine. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1474 (2000), Apr, Nr. 2, S. 196–200
- [15] MERRIFIELD, R: Automated synthesis of peptides. In: *Science* 150 (1965), Oct, Nr. 3693, S. 178–185
- [16] MERRIFIELD, R ; STEWART, J ; JERNBERG, N: Instrument for automated synthesis of peptides. In: *Analytical chemistry* 38 (1966), Dec, Nr. 13, S. 1905–1914
- [17] CHAN, W ; WHITE, P: *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Practical Approach Series)*. Oxford University Press, 2000

- [18] ROSE, K ; ZENG, W ; REGAMEY, P ; CHERNUSHEVICH, I ; STANDING, K ; GAERTNER, H: Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkages. In: *Bioconjugate Chemistry* 7 (1996), Jan, S. 552–556
- [19] KOCHENDOERFER, G ; TACK, J ; CRESSMAN, S: Total chemical synthesis of a 27 kDa TASP protein derived from the MscL ion channel of *M. tuberculosis* by ketoxime-forming ligation. In: *Bioconjugate Chemistry* 13 (2002), Dec, S. 474–480
- [20] SCHNOLZER, M ; KENT, S: Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. In: *Science* 256 (1992), Apr, S. 221–225
- [21] LIU, C ; TAM, J: Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994), Mar, S. 6584–6588
- [22] SAXON, E ; ARMSTRONG, J ; BERTOZZI, C: A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. In: *Organic Letters* 2 (2000), Jun, Nr. 14, S. 2141–2143
- [23] STAUDINGER, H ; MEYER, J: Über neue organische phosphorverbindungen III. Phosphinmethylen-derivate und phosphinimine. In: *Helvetica Chimica Acta* 2 (1919), Nr. 1, S. 635–646
- [24] MACHOVA, Z ; EGDELKRAUT-GOTTANKA, R von ; WEHOFSKY, N ; BORDUSA, F ; BECK-SICKINGER, A: Expressed enzymatic ligation for the semisynthesis of chemically modified proteins. In: *Angewandte Chemie International Edition* 42 (2003), Oct, Nr. 40, S. 4916–4918
- [25] DAVID, R ; RICHTER, M ; BECK-SICKINGER, A: Expressed protein ligation - Method and applications. In: *European Journal of Biochemistry* 271 (2004), Jan, Nr. 4, S. 663–677
- [26] DAWSON, P ; MUIR, T ; CLARK-LEWIS, I ; KENT, S: Synthesis of proteins by native chemical ligation. In: *Science* 266 (2008), Nov, S. 776–779
- [27] WIELAND, T ; BOKELMANN, E ; BAUER, L ; LANG, H ; LAU, H: Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. In: *Justus Liebig's Annalen der Chemie* 583 (1953), Nr. 1, S. 129–149
- [28] HACKENG, T ; GRIFFIN, J ; DAWSON, P: Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), Aug, S. 10068–10073
- [29] DAWSON, P ; KENT, S: Synthesis of native proteins by chemical ligation. In: *Annual review of biochemistry* 69 (2000), Aug, S. 923–960
- [30] DAVID, R ; MACHOVA, Z ; BECK-SICKINGER, A: Semisynthesis and application of carboxyfluorescein-labelled biologically active human interleukin-8. In: *Biological Chemistry* 384 (2003), Jan, Nr. 12, S. 1619–1630
- [31] GUTTE, B ; MERRIFIELD, R: The synthesis of ribonuclease A. In: *Journal of Biological Chemistry* 246 (1971), Sep, Nr. 6, S. 1922–1941
- [32] PALASEK, S ; COX, Z ; COLLINS, J: Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. In: *Journal of Peptide Science* 13 (2007), Nov, S. 143–148
- [33] BENOITON, N: Sometimes it is neither a racemisation nor an epimerisation but an enantiomerisation. A plea for preciseness in the use of terms describing stereomutations that occur in peptide synthesis. In: *International Journal of Peptide and Protein Research* 44 (1994), Nr. 4, S. 399–400
- [34] RIESTER, D ; WIESMÜLLER, K ; STOLL, D ; KUHN, R: Racemization of amino acids in solid-phase peptide synthesis investigated by capillary electrophoresis. In: *Analytical chemistry* 68 (1996), Jul, S. 2361–2365

- [35] CHANG, T ; JACKSON, D ; BURNIER, J ; WELLS, J: Subtiligase: a tool for semisynthesis of proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994), Dec, Nr. 26, S. 12544–12548
- [36] SCHELLENBERGER, V ; JAKUBKE, H: Protease-Catalyzed Kinetically Controlled Peptide Synthesis. In: *Angewandte Chemie International Edition in English* 30 (1991), Nr. 11, S. 1437–1449
- [37] BORDUSA, Frank: Proteases in organic synthesis. In: *Chemical Reviews* 102 (2002), Dec, Nr. 12, S. 4817–4868
- [38] BERGMANN, M ; FRAENKEL-CONRAT, H: The role of specificity in the enzymatic synthesis of proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* (1937), May, S. 707–720
- [39] BERGMANN, M ; FRUTON, J: Some synthetic and hydrolytic experiments with chymotrypsin. In: *Journal of Biological Chemistry* 124 (1938), Jan, S. 321–329
- [40] BERGMANN, M ; FRAENKEL-CONRAT, H: The enzymatic synthesis of peptide bonds. In: *Journal of Biological Chemistry* (1938), Jan, S. 1–6
- [41] BERGMANN, M ; BEHRENS, O: On the asymmetric course of the enzymatic synthesis of peptide bonds. In: *Journal of Biological Chemistry* (1938), Feb, S. 7–10
- [42] SAWANT, R ; NAGENDRAN, S: Protease: An enzyme with multiple industrial applications. In: *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences* 3 (2014), Nr. 6, S. 568–579
- [43] ALLEN, C ; STROMER, V ; SMITH, F ; LACY, G ; MOUNT, M: Complementation of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* protease mutant with a protease encoding cosmid. In: *Molecular Genetics and Genomics* 202 (1986), S. 276–279
- [44] CHEONG, C ; CHUN, S ; KIM, Y: Production and properties of an alkaline protease from *Pseudomonas* sp. SJ-320. In: *Korean Biodiversity Journal* 26 (1993), S. 470–484
- [45] ARGOS, P: A sensitive procedure to compare amino acid sequences. In: *Journal of Molecular Biology* 193 (1987), S. 385–396
- [46] RAO, M ; TANKSALE, A ; GHATGE, M ; DESHPANDE, V: Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (1998), Aug, Nr. 3, S. 597–635
- [47] AURACHALAM, C ; SARITHA, K: Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry. In: *Indian Journal of Science and Technology* 2 (2009), Nr. 12, S. 29–32
- [48] SAMAL, B ; KARAN, B ; STABINSKY, Y: Stability of two novel serine Proteinases in commercial laundry detergent formulations. In: *Biotechnology and Bioengineering* 35 (1990), S. 650–652
- [49] CRAIK, C.S ; PAGE, M.J ; MADISON, E.L: Proteases as therapeutics. In: *Biochemical journal* 435 (2011), S. 1–16
- [50] CHANALIA, P ; GANDHI, D ; JODHA, D ; SINGH, J: Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. In: *Reviews in Medical Microbiology* 22 (2011), Nr. 4, S. 96–101
- [51] JAKUBKE, H ; KUHLE, P ; KÖNNECKE, A: Grundprinzipien der proteasekatalysierten Knüpfung der Peptidbindung. In: *Angewandte Chemie* 97 (1985), Nr. 2, S. 79–140
- [52] SCHELLENBERGER, V ; JAKUBKE, H: Proteasekatalysierte kinetisch kontrollierte Peptidsynthese. In: *Angewandte Chemie* 103 (1991), Nr. 11, S. 1440–1452
- [53] HOFF, J van't: Über die zunehmende Bedeutung der anorganischen Chemie. In: *Zeitschrift für anorganische Chemie* 18 (1898), S. 1–13

- [54] GOLOLOBOV, M ; BORISOV, I ; BELIKOV, V ; SVEDAS, V: Acyl group transfer by proteases forming acyl-enzyme intermediate: kinetic model analysis. In: *Biotechnol. Bioeng* 32 (1988), S. 866–872
- [55] LAANE, C ; BOEREN, S ; VOS, K ; VEEGER, C: Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. In: *Biotechnology and Bioengineering* 30 (1987), Nr. 1, S. 81–87
- [56] CARREA, Giacomo ; RIVA, Sergio: *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008
- [57] SCHAAF, R ; JAKUBKE, H: Studies on enzymatic peptide synthesis in biphasic aqueous-organic systems with product extraction. In: *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly* 118 (1987), S. 1279–1288
- [58] NADIM, A ; STOINEVA, I ; GALUNSKY, B ; KASCHE, V ; PETKOV, D: Mass transfer induced interchange of the kinetic and thermodynamic control of enzymic peptide synthesis in biphasic water-organic systems. In: *Biotechnology techniques* 6 (1992), Nr. 6, S. 539–544
- [59] RIVAL, S ; SAULNIER, J ; WALLACH, J: On the mechanism of action of pseudolysin: Kinetic study of the enzymatic condensation of Z-Ala with Phe-NH<sub>2</sub>. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 17 (2000), Jan, Nr. 6, S. 417–429
- [60] LOBELL, M ; SCHNEIDER, M: Pronase catalysed peptide syntheses. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* (1998), Jan, Nr. 2, S. 319–325
- [61] BORDUSA, F ; JAKUBKE, H: *Method for Synthesising Peptides Peptide Mimetics and Proteins*. United States Patent Application Publication, Feb 2004
- [62] KIDD, R ; SEARS, P ; HUANG, D ; WITTE, K ; WONG, C ; FARBER, G: Breaking the low barrier hydrogen bond in a serine protease. In: *Protein Science* 8 (1999), Nr. 2, S. 410–417
- [63] KLIBANOV, A: Improving enzymes by using them in organic solvents. In: *Nature* 409 (2001), Jan, S. 241–246
- [64] BORDUSA, F: Substrate mimetics in protease catalysis: characteristics, kinetics, and synthetic utility. In: *Current Protein and Peptide Science* 3 (2002), Nr. 2, S. 159–180
- [65] SCHUSTER, M ; AAVIKSAAR, A ; JAKUBKE, H: Enzyme-catalyzed peptide synthesis in ice. In: *Tetrahedron* 46 (1990), Jun, Nr. 24, S. 8093–8102
- [66] ULJIN, R ; ERBELDINGER, M ; HALLING, P: Comparison of methods for thermolysin-catalyzed peptide synthesis including a novel more active catalyst. In: *Biotechnology and Bioengineering* 69 (2000), Nr. 6, S. 633–638
- [67] WEHOFSKY, N ; KIRBACH, S ; HAENSLER, M ; WISSMANN, J ; BORDUSA, F: Substrate mimetics and freezing strategy: a useful combination that broadens the scope of proteases for synthesis. In: *Organic Letters* 2 (2000), Nr. 14, S. 2027–2030
- [68] WEHOFSKY, N ; HAENSLER, M ; KIRBACH, S ; WISSMANN, J ; BORDUSA, F: Effect of freezing on the enzymatic coupling of specific amino acid-containing peptide fragments. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 11 (2000), Nr. 11, S. 2421–2428
- [69] ULLMANN, G ; HAENSLER, M ; GRUENDER, W ; WAGNER, M ; HOFMANN, H ; JAKUBKE, H-D: Influence of freeze-concentration effect on proteinase-catalysed peptide synthesis in frozen aqueous systems. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology* 1338 (1997), Nr. 2, S. 253–258
- [70] SCHELLENBERGER, V ; SCHELLENBERGER, U ; JAKUBKE, H ; ZAPEVALOVA, N ; MITIN, Y: Protease-Catalyzed Peptide-Synthesis using Inverse Substrates - The Synthesis of Pro-Xaa-Bonds by Trypsin. In: *Biotechnology and Bioengineering* 38 (1991), Dec, Nr. 3, S. 319–321

- [71] SCHELLENBERGER, V ; JAKUBKE, H ; ZAPEVALOVA, N ; MITIN, Y: Protease-Catalyzed Peptide-Synthesis Using Inverse Substrates - The Influence of Reaction Conditions on the Trypsin Acyl Transfer Efficiency. In: *Biotechnology and Bioengineering* 38 (1991), Sep, Nr. 1, S. 104–108
- [72] SEKIZAKI, H ; ITOH, K ; TOYOTA, E ; TANIZAWA, K: Trypsin-catalyzed peptide synthesis with various p-guanidinophenyl esters as acyl donors. In: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 44 (1996), Jan, Nr. 8, S. 1585–1587
- [73] ITOH, K ; SEKIZAKI, H ; TOYOTA, E ; FUJIWARA, N ; TANIZAWA, K: Application of inverse substrates to trypsin-catalyzed peptide synthesis. In: *Bioorganic chemistry* 24 (1996), Jan, Nr. 7, S. 59–68
- [74] BORDUSA, F ; ULLMANN, D ; JAKUBKE, H: Protease-catalyzed peptide synthesis from *N*- to *C*-terminus: An advantageous strategy. In: *Angewandte Chemie International Edition* 36 (1997), Jan, Nr. 10, S. 1099–1101
- [75] SCHECHTER, I ; BERGER, A: On the active site of proteases. III. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 32 (1968), Aug, Nr. 5, S. 898–902
- [76] THORMANN, M ; THUST, S ; HOFMANN, H ; BORDUSA, F: Protease-catalyzed hydrolysis of substrate mimetics (inverse substrates): A new approach reveals a new mechanism. In: *Biochemistry* 38 (1999), S. 6056–6062
- [77] RUDOLPH, R ; BORDUSA, F ; WEHOFSKY, N: *Method for the synthesis and selective biocatalytic modification of peptides, peptide mimetics and proteins*. United States Patent Application Publication, Jul 2006
- [78] LIEBSCHER, Sandra: *N- und C-terminale Modifizierung von Polypeptiden und Proteinen*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., Apr 2007
- [79] RALL, Kathrin: *Untersuchungen zur Optimierung der Serinprotease Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthese*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., Jun 2004. – 1–135 S.
- [80] CARELL, T: *Vorlesung Peptide und Proteine*. In: *Chemie an der Grenze zu den Biowissenschaften*, Ludwig Maximilians University Munich - Chemistry Department, 2006
- [81] BORDUSA, F: Nonconventional amide bond formation catalysis: programming enzyme specificity with substrate mimetics. In: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 (2000), Nr. 5, S. 469–485
- [82] GÜNTHER, R ; ELSNER, C ; SCHMIDT, S ; HOFMANN, H ; BORDUSA, F: On the rational design of substrate mimetics: the function of docking approaches for the prediction of protease specificities. In: *Organic & Biomolecular Chemistry* 2 (2004), Jan, Nr. 10, S. 1442
- [83] LIEM, R ; SCHERAGA, H: Mechanism of action of thrombin on fibrinogen :: III. Partial mapping of the active sites of thrombin and trypsin. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 158 (1973), S. 387–395
- [84] POZSGAY, M ; SZABÓ, G ; BAJUSZ, S ; SIMONSSON, R ; GASPAS, R ; ELÖDI, P: Investigation of the substrate-binding site of human plasmin using tripeptidyl-p-nitroanilide substrates. In: *European Journal of Biochemistry* 115 (1981), S. 497–502
- [85] HEDSTROM, L ; SZILAGYI, L ; RUTTER, W: Converting trypsin to chymotrypsin: The role of surface loops. In: *Science* 255 (1992), Jan
- [86] HUNG, S ; HEDSTROM, L: Converting trypsin to elastase: substitution of the S1 site and adjacent loops reconstitutes esterase specificity but not amidase activity. In: *Protein Engineering* 11 (1998), Nr. 8, S. 669–673

- [87] HUNG, S ; HEDSTROM, L: Converting trypsin to elastase: substitution of the S1 site and adjacent loops reconstitutes esterase specificity but not amidase activity. In: *Protein Engineering* 11 (1998), Nr. 8, S. 669–673
- [88] WILLETT, W ; GILLMOR, S ; PERONA, J ; FLETTERICK, R ; CRAIK, C: Engineered Metal Regulation of Trypsin Specificity. In: *Biochemistry* 34 (1995), May, Nr. 7, S. 2172–2180
- [89] WILLETT, W ; GILLMOR, S ; PERONA, J ; FLETTERICK, R ; CRAIK, C: Engineered metal regulation of trypsin specificity. In: *Biochemistry* 34 (1995), Nr. 7, S. 2172–2180
- [90] RALL, K ; BORDUSA, F: Substrate Mimetics-Specific Peptide Ligases: Studies on the Synthetic Utility of a Zymogen and Zymogen-Like Enzymes. In: *The Journal of Organic Chemistry* 67 (2002), Dec, Nr. 25, S. 9103–9106
- [91] BORDUSA, F ; JAKUBKE, H: *Method for the selective modification of peptides and proteins*. United States Patent Application Publication, Apr 2004
- [92] HOESS, E ; BORDUSA, F: *C-terminal modification of polypeptides*. United States Patent Application Publication, Feb 2007
- [93] PROFT, T: Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation. In: *Biotechnology Letters* 32 (2010), Sep, S. 1–10
- [94] HOYER, K ; MAHLERT, C ; MARAHIEL, M: The iterative gramicidin S thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. In: *Chemistry & Biology* 14 (2007), S. 13–22
- [95] ZONG, Y ; BICE, T ; TON-THAT, H ; SCHNEEWIND, O ; NARAYANA, S: Crystal structures of *Staphylococcus aureus* sortase A and its substrate complex. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), Nr. 30, S. 31383–31389
- [96] KRUGER, R ; DOSTAL, P ; MCCAFFERTY, D: An economical and preparative orthogonal solid phase synthesis of fluorescein and rhodamine derivatized peptides: FRET substrates for the *Staphylococcus aureus* sortase SrtA transpeptidase reaction. In: *Chemical Communications* (2002), Aug, Nr. 18, S. 2092–2093
- [97] GHUYSEN, J: Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. In: *Bacteriological Reviews* 32 (1968), Dec, Nr. 4, S. 425–464
- [98] VERWER, R ; NANNINGA, N ; KECK, W ; SCHWARZ, U: Arrangement of glycan chains in the Sacculus of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 136 (1978), Aug, Nr. 2, S. 723–729
- [99] PINK, D ; MOELLER, J ; QUINN, B ; JERICHO, M ; BEVERIDGE, T: On the Architecture of the gram-negative bacterial murein sacculus. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000), Oct, Nr. 20, S. 5925–5930
- [100] LODISH, H: *Molecular Cell Biology*. W H Freeman, 2003
- [101] TON-THAT, H ; LIU, G ; MAZMANIAN, S ; FAULL, K ; SCHNEEWIND, O: Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), Oct, Nr. 22, S. 12424–12429
- [102] MAZMANIAN, S ; LIU, G ; TON-THAT, H ; SCHNEEWIND, O: *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. In: *Science* 285 (1999), Nr. 5428, S. 760–763
- [103] MAO, H ; HART, S ; SCHINK, A ; POLLOK, B: Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 9, S. 2670–2671

- [104] MATSUMOTO, T ; SAWAMOTO, S ; SAKAMOTO, T ; TANAKA, T ; FUKUDA, H ; KONDO, A: Site-specific tetrameric streptavidin-protein conjugation using sortase A. In: *Journal of Biotechnology* 152 (2011), Jan, Nr. 1-2, S. 37–42
- [105] KANG, D ; GHO, Y S. ; SUH, M ; KANG, C: Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23 (2002), May, Nr. 11, S. 1511–1512
- [106] DÜRFAHRT, T ; MARAHIEL, M: Peptidantibiotika vom molekularen Fließband. In: *Nachrichten aus der Chemie* 53 (2005), Nr. 5, S. 507–513
- [107] HUSI, H ; SCHÖRGENDORFER, K ; STEMPPFER, G ; TAYLOR, P ; WALKINSHAW, M: Prediction of substrate-specific pockets in cyclosporin synthetase. In: *FEBS Letters* 414 (1997), Nr. 3, S. 532–536
- [108] TRAUGER, J ; KOHLI, R ; MOOTZ, H ; MARAHIEL, M ; WALSH, C: Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. In: *Nature* 407 (2000), Nr. 6801, S. 215–218
- [109] KOHLI, R ; WALSH, C ; BURKART, M: Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. In: *Nature* 418 (2002), Nr. 6898, S. 658–661
- [110] SIEBER, S ; MARAHIEL, M: Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. In: *Journal of Bacteriology* 185 (2003), Nr. 24, S. 7036–7043
- [111] DEVEDJIEV, Y ; DAUTER, Z ; KUZNETSOV, S ; JONES, T ; DEREWENDA, Z: Crystal structure of the human acyl protein thioesterase I from a single X-ray data set to 1.5 Å. In: *Structure* 8 (2000), Nr. 11, S. 1137–1146
- [112] BRUNER, S ; WEBER, T ; KOHLI, R ; SCHWARZER, D ; MARAHIEL, M ; WALSH, C ; STUBBS, M: Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. In: *Structure* 10 (2002), Jan, S. 301–310
- [113] ROCHE, E ; WALSH, C: Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptide synthesis. In: *Biochemistry* 42 (2003), Jan, S. 1334–1344
- [114] MOOTZ, H ; SCHWARZER, . . . , D: Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. In: *ChemBioChem* 3 (2002), S. 490–504
- [115] BORDUSA, F: Enzymes for peptide cyclization. In: *ChemBiochem* 2 (2001), Nr. 6, S. 405–409
- [116] DECK, P ; PENDZIALEK, D ; BIEL, M ; WAGNER, M ; POPKIROVA, B ; LUDOLPH, B ; KRAGOL, G ; KÜHLMANN, J ; GIANNIS, A ; WALDMANN, H: Development and biological evaluation of acyl protein thioesterase 1 (APT1) inhibitors. In: *Angewandte Chemie* 117 (2005), Nr. 31, S. 5055–5060
- [117] BURKE, M ; TAO, J ; WALSH, C: Chemoenzymatic route to macrocyclic hybrid peptide/polyketide-like molecules. In: *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003), Jan, S. 7160–7161
- [118] WAGNER, B ; SIEBER, S ; BAUMANN, M ; MARAHIEL, M: Solvent engineering substantially enhances the chemoenzymatic production of surfactin. In: *ChemBiochem* 7 (2006), S. 595–597
- [119] YEH, E ; LIN, H ; CLUGSTON, S ; KOHLI, R ; WALSH, C: Enhanced macrocyclizing activity of the thioesterase from tyrocidine synthetase in presence of nonionic detergent. In: *Chemistry and Biology* 11 (2004), Nr. 11, S. 1573–1578
- [120] SIEBER, S ; TAO, J ; WALSH, C ; MARAHIEL, M: Peptidyl thiophenols as substrates for nonribosomal peptide cyclases. In: *Angewandte Chemie* 116 (2004), S. 499–504
- [121] TSENG, C ; BRUNER, S ; KOHLI, R ; MARAHIEL, M ; WALSH, C ; SIEBER, S: Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. In: *Biochemistry* 41 (2002), S. 13350–13359

- [122] HEDSTROM, L: Serine protease mechanism and specificity. In: *Chemical Reviews* 102 (2002), Nr. 12, S. 4501–4524
- [123] WARSHEL, A ; NARAY-SZABO, G ; SUSSMAN, F ; HWANG, J: How do serine proteases really work? In: *Biochemistry* 28 (1989), Nr. 9, S. 3629–3637
- [124] KRAUT, J: Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. In: *Annual review of biochemistry* 46 (1977), Jan, S. 331–358
- [125] KOHLI, R ; WALSH, C: Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. In: *Chemical Communications* (2003), Jan, Nr. 3, S. 297–307
- [126] HEDSTROM, L ; LIN, T ; FAST, W: Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nr. 14, S. 4515–4523
- [127] WEST, J ; SCHOLTEN, J ; STOLOWICH, N ; HOGG, J ; SCOTT, A ; WONG, C: Modification of proteases to esterases for peptide synthesis: Methylchymotrypsin. In: *Journal of the American Chemical Society* 110 (1988), Jan, Nr. 11, S. 3709–3710
- [128] WONG, C ; WANG, K: New developments in enzymatic peptide synthesis. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 47 (1991), Nr. 11, S. 1123–1129
- [129] ROBERTUS, J ; KRAUT, J ; ALDEN, R ; BIRKTOFT, J: Subtilisin. Stereochemical mechanism involving transition-state stabilization. In: *Biochemistry* 11 (1972), Jan, Nr. 23, S. 4293–4303
- [130] BOBOFCHAK, K ; PINEDA, A ; MATHEWS, F ; CERA, E: Energetic and structural consequences of perturbing Gly-193 in the oxyanion hole of serine proteases. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), Jan, Nr. 27, S. 25644–25650
- [131] KREEVOY, W Cleland M.: Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis. In: *Science* 264 (1994), Jun, S. 1887–1890
- [132] CASSIDY, C ; LIN, J ; FREY, P: A new concept for the mechanism of action of chymotrypsin: The role of the low-barrier hydrogen bond. In: *Biochemistry* 36 (1997), Jan, S. 4576–4584
- [133] WARSHEL, A ; PAPAZYAN, A ; KOLLMAN, P: On low-barrier hydrogen bonds and enzyme catalysis. In: *Science* 269 (1995), Jul, S. 102–104
- [134] VOET, D ; VOET, J: *Biochemistry*. 4. Wiley, 2010
- [135] WEINER, S ; SEIBEL, G ; KOLLMAN, P: The nature of enzyme catalysis in trypsin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (1986), Nr. 3, S. 649–653
- [136] NAKAGAWA, S ; UMEYAMA, H: Role of catalytic residues in the formation of a tetrahedral adduct in the acylation reaction of bovine  $\beta$ -trypsin: A molecular orbital study. In: *Journal of Molecular Biology* 179 (1984), Nr. 1, S. 103–123
- [137] FISCHER, G ; BARTH, A: Kinetische Untersuchungen der Peptidhydrolyse durch Dipeptidyl-Peptidase IV - Ein Beitrag zum Katalysemechanismus der Serinproteasen. In: *Oehme P. Löwe H. Göres E.: Beiträge zur Wirkstofforschung* (1981), Nr. 11, S. 105–133
- [138] KUO, L ; FUKUYAMA, J M. ; MAKINEN, M W.: Catalytic conformation of carboxypeptidase A\* 1:: The structure of a true reaction intermediate stabilized at subzero temperatures. In: *Journal of Molecular Biology* (1983), May, Nr. 163, S. 63–105
- [139] WANG, E ; HUNG, S ; CAHOON, M ; HEDSTROM, L: The role of the Cys191-Cys220 disulfide bond in trypsin: new targets for engineering substrate specificity. In: *Protein Engineering* 10 (1997), Apr, Nr. 4, S. 405–411

- [140] ZSEBO, K M. ; LU, H S. ; FIESCHKO, J C. ; GOLDSTEIN, L ; DAVIS, J ; DUKER, K ; SUGGS, S V. ; LAI, P H. ; BITTER, G A.: Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro-alpha-factor leader region. In: *Journal of Biological Chemistry* 261 (1986), Nr. 13, S. 5858-5865
- [141] SAXENA, V ; WETLAUFER, D: Formation of three-dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme. In: *Biochemistry* 9 (1970), Jan, Nr. 25, S. 5015-5023
- [142] WALSH, G ; KNÄBELEIN, J ; MÜLLER, R ; SCHLEEF, M ; GELLISON, G ; REHM, H ; REED, G ; PÜHLER, A ; STADLER, P ; MOUNTAIN, A ; NEY, U ; SCHOMBURG, D ; SCHMID, R ; HAMMELEHLE, R ; GELLISSEN, G (Hrsg.): *Production of Recombinant Proteins - Novel Microbial Eukaryotic Expression Systems*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005
- [143] KUNITZ, M: Formation of trypsin from trypsinogen by an enzyme produced by a mold of the genus *Penicillium*. In: *The Journal of general physiology* (1938), Nov, S. 601-620
- [144] KUNITZ, M: Formation of trypsin from crystalline trypsinogen by means of enterokinase. In: *The Journal of general physiology* (1939), Mar, S. 429-446
- [145] PORATH, J ; CARLSSON, J ; OLSSON, I ; BELFRAGE, G: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. In: *Nature* 258 (1975), Dezember, S. 598-599
- [146] *Affinity Chromatographie - Principles and Methods*. Amersham Biosciences, 2002
- [147] VUENTO, M ; VAHERI, A: Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions. In: *Biochemical journal* 183 (1979), Nov, Nr. 2, S. 331-337
- [148] HIXSON, H: Affinity chromatography: Purification of bovine trypsin and thrombin\* 1. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 154 (1973), Nr. 2, S. 501-509
- [149] BAILLARGEON, M ; LASKOWSKI, M ; NEVES, D ; PORUBCAN, M ; SANTINI, R ; MARKLEY, J: Soybean trypsin inhibitor (Kunitz) and its complex with trypsin. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of the reactive site arginine. In: *Biochemistry* 19 (1980), Jan, Nr. 25, S. 5703
- [150] SWEET, R ; WRIGHT, H ; JANIN, J ; CHOTHIA, C ; BLOW, D: Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6 resolution. In: *Biochemistry* 13 (1974), Nr. 20, S. 4212-4228
- [151] OBST, U: *De-novo-Design und Synthese neuartiger, nichtpeptidischer Thrombin-Inhibitoren.*, ETH Zürich, Diss., 1997
- [152] PERONA, J ; CRAIK, C: Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. In: *Protein Science* 4 (1995), S. 337-360
- [153] PERONA, J ; HEDSTROM, L ; RUTTER, W ; FLETTERICK, R: Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. In: *Biochemistry* 34 (1995), Nr. 5, S. 1489-1499
- [154] SCHMIDT, A ; OGAWA, T ; GAILANI, D ; BAJAJ, S: Structural role of Gly(193) in serine proteases: investigations of a G555E (GLY193 in chymotrypsin) mutant of blood coagulation factor XI. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), Jul, Nr. 28, S. 29485-29492
- [155] SZMOLA, R ; KURKOR, Z ; SHIN-TÓTH, M: Human Mesotrypsin Is a Unique Digestive Protease Specialized for the Degradation of Trypsin Inhibitors. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Sep, Nr. 49, S. 48580-48589
- [156] ASCENZI, P ; MENEGATTI, E ; GUARNERI, M ; BORTOLOTTI, F ; ANTONINI, E: Catalytic properties of serine proteases. 2. Comparison between human urinary kallikrein and human urokinase, bovine  $\beta$ -trypsin, bovine thrombin, and bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. In: *Biochemistry* 21 (1982), Jan, Nr. 10, S. 2483-2490

- [157] ASCENZI, P ; COLETTA, M ; AMICONI, G ; BOLOGNESI, M ; GUARNERI, M ; MENEGATTI, E: Zymogen activation: effect of peptides sequentially related to the bovine  $\beta$ -trypsin *N*-terminus on Kazal inhibitor and benzamidine binding to bovine trypsinogen. In: *Journal of Molecular Recognition* 1 (1988), Jun, Nr. 3, S. 130–137
- [158] SAMBROOK, J ; RUSSELL, D: *Molecular cloning: a laboratory manual, Volume 1-3*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001
- [159] SANGER, F ; NICKLEN, S ; COULSON, A: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (1977), Jan, Nr. 12, S. 5463–5467
- [160] LAEMMLI, U: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, Nr. 5259, S. 680–685
- [161] SCHÄGGER, H ; JAGOW, G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In: *Analytical Biochemistry* 166 (1987), Nr. 2, S. 368–379
- [162] REHM, H: *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics*. 5. Elsevier Spektrum akademischer Verlag, 2005
- [163] BENDER, M ; BEGUE-CANT, M ; BLAKELEY, R ; BRUBACHER, L ; FEDER, J ; GUNTER, C ; KEZDY, F ; KILLHEFFER, J ; MARSHALL, T ; MILLER, C ; ROESKE, R ; STOOPS, K: The Determination of the Concentration of Hydrolytic Enzyme Solutions:  $\alpha$ -Chymotrypsin, Trypsin, Papain, Elastase, Subtilisin, and Acetylcholinesterase I. In: *Journal of the American Chemical Society* 88 (1966), Jan, Nr. 24, S. 5890–5913
- [164] CHASE, T ; SHAW, E: Comparison of the esterase activities of trypsin, plasmin, and thrombin on guanidinobenzoate esters. Titration of the enzymes. In: *Biochemistry* 8 (1969), Nr. 5, S. 2212–2224
- [165] CHASE, T ; SHAW, E: p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 29 (1967), Nr. 4, S. 508
- [166] FISCHER, E: Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 27 (1894), Jan, Nr. 545, S. 2985–2993
- [167] FISCHER, E: Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. II. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 27 (1894), Jan, Nr. 644, S. 3479–3483
- [168] FARADY, C.J ; CRAIK, C.S: Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. In: *ChemBioChem* 11 (2010), Nov, Nr. 17, S. 2341–2346
- [169] TÓTH, J ; SIMON, Z ; MEDVECZKY, P ; GOMBOS, L ; JELINEK, B ; SZILÁGYI, L ; GRÁF, L ; MÁLNÁSI-CSIZMADIA, A: Site directed mutagenesis at position 193 of human trypsin 4 alters the rate of conformational change during activation: Role of local internal viscosity in protein dynamics. In: *Proteins* 67 (2007), Apr, Nr. 4, S. 1119–1127
- [170] GOMBOS, L ; KARDOS, J ; PATTHY, A ; MEDVECZKY, P ; SZILÁGYI, L ; MÁLNÁSI-CSIZMADIA, A ; GRÁF, L: Probing conformational plasticity of the activation domain of trypsin: the role of glycine hinges. In: *Biochemistry* 47 (2008), Nr. 6, S. 1675–1684
- [171] MITZNER, R ; LEMKE, F: Lösungsmittelabhängigkeit der Spontanhydrolyse von Essigsäureanhydrid. In: *Zeitschrift für Chemie* 25 (1985), Nr. 11, S. 406–407
- [172] MORGAN, J ; MUMFORD, P: Preliminary studies of energy expenditure in infants under six months of age. In: *Acta Paediatrica* 70 (1981), Jan, Nr. 1, S. 15–19

- [173] MALTHOUSE, J ; MACKENZIE, N ; BOYD, A ; SCOTT, A: Detection of a tetrahedral adduct in a trypsin-chloromethyl ketone specific inhibitor complex by  $^{13}\text{C}$  NMR. In: *Journal of the American Chemical Society* 105 (1983), Nr. 6, S. 1685–1686
- [174] TSILIKOUNAS, E ; RAO, T ; GUTHEIL, W ; BACHOVCHIN, W:  $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of the catalytic histidine in chloromethyl ketone-inhibited complexes of serine proteases. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nr. 7, S. 2437–2444
- [175] SHAW, E ; MARES-GUIA, M ; COHEN, W: Evidence for an Active-Center Histidine in Trypsin through Use of a Specific Reagent, 1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the Chloromethyl Ketone Derived from N-Tosyl-L-lysine\*. In: *Biochemistry* 4 (1965), Nr. 10, S. 2219–2224
- [176] PETRA, P ; COHEN, W ; SHAW, E: Isolation and characterization of the alkylated histidine from TLCK inhibited trypsin. In: *Biochemical and biophysical research communications* 21 (1965), Nr. 6, S. 612–618
- [177] BEER, A: Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. In: *Annalen der Physik und Chemie* (1852), Nr. 86, S. 78–88
- [178] MA, W ; TANG, Chao ; LAI, Luhua: Specificity of Trypsin and Chymotrypsin: Loop Motion Controlled Dynamic Correlation as a Determinant. In: *Biophysical Journal* 89 (2005), May, Nr. 2, S. 1183–1193
- [179] PERONA, J ; CRAIK, C: Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nov, Nr. 48, S. 29987–29990
- [180] RAMACHANDRAN, G ; RAMAKRISHNAN, C ; SASISEKHARAN, V: Stereochemistry of polypeptide chain configurations. In: *Journal of Molecular Biology* 7 (1963), Nr. 1, S. 95–99
- [181] LEVITT, M: Effect of proline residues on protein folding. In: *Journal of Molecular Biology* 145 (1981), May, S. 251–263
- [182] SINHA, N ; LIGHT, A: Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on Agarose beads. In: *Journal of Biological Chemistry* 250 (1975), Nov, Nr. 22, S. 8624–8629
- [183] LIENER, I: The essentiality of the disulfide linkages in trypsin. In: *Journal of Biological Chemistry* 225 (1957), Nr. 2, S. 1061
- [184] ROESLER, K ; RAO, A: A single disulfide bond restores thermodynamic and proteolytic stability to an extensively mutated protein. In: *Protein science* 9 (2000), Jan, S. 1642–1650
- [185] EPSTEIN, C ; ANFINSEN, C: The reversible reduction of disulfide bonds in trypsin and ribonuclease coupled to carboxymethyl cellulose. In: *Journal of Biological Chemistry* 237 (1962), Jul, Nr. 7, S. 2175–2179
- [186] SIMON, A: *Diplomarbeit - Studien zur Unterdrückung der Autolyse von Trypsin*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit, Jun 2008
- [187] ELLMAN, G: Tissue sulfhydryl groups. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82 (1959), Nr. 1, S. 70–77
- [188] ELLMAN, G: A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74 (1958), Nr. 2, S. 443–450
- [189] SLIWKOWSKI, M ; LEVINE, R: Labeling of cysteine-containing peptides with 2-nitro-5-thiobenzoic acid. In: *Analytical Biochemistry* 147 (1985), Nr. 2, S. 369–373
- [190] RIDDLES, P ; BLAKELEY, R ; ZERNER, B: Ellman's reagent: 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)–a reexamination. In: *Analytical biochemistry* 94 (1979), Jul, Nr. 1, S. 75–81

- [191] ULLMANN, D ; JAKUBKE, H: The specificity of clostripain from *Clostridium histolyticum*. Mapping the S' subsites via acyl transfer to amino acid amides and peptides. In: *European Journal of Biochemistry* 223 (1994), Aug, Nr. 3, S. 865–72
- [192] GILLES, A ; IMHOFF, J ; KEIL, B:  $\alpha$ -Clostripain. Chemical characterization, activity, and thiol content of the highly active form of clostripain. In: *Journal of Biological Chemistry* 254 (1979), Nr. 5, S. 1462–1468
- [193] WHITMORE, L ; WALLACE, B: Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. In: *Biopolymers* 89 (2008), Nr. 5, S. 392–400
- [194] GREENFIELD, N: Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. In: *Nature protocols* 1 (2006), Dec, Nr. 6, S. 2527–2535
- [195] HUANG, H ; ZHAO, M: Changes of trypsin in activity and secondary structure induced by complex with trypsin inhibitors and tea polyphenol. In: *European Food Research and Technology* 227 (2008), Nr. 2, S. 361–365
- [196] YANG, J: Calculation of protein conformation from circular dichroism. In: *Methods in Enzymology* 130 (1986), S. 208–269
- [197] CAROLINA, P ; MIGUEL, A: K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. In: *BMC Structural Biology* 8 (2008), Jan, Nr. 1, S. 25
- [198] BRYSON, K ; MCGUFFIN, L ; MARSDEN, R ; WARD, J ; SODHI, J ; JONES, D: Protein structure prediction servers at University College London. In: *Nucleic Acids Research* 33 (2005), S. 36–38
- [199] JONES, D: Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. In: *Journal of Molecular Biology* 292 (1999), S. 195–202
- [200] CHEN, Y ; YANG, J ; CHAU, K: Determination of the helix and form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. In: *Biochemistry* 13 (1974), Jan, Nr. 16, S. 3350–3351
- [201] LOTTSPEICH, F ; ZORBAS, H: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1998. – 49 f S.
- [202] HESS, B: *Enzyme im Blutplasma. Biochemie und Klinik - Monographien in zwangloser Folge*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1966. – 155 f S.
- [203] KLEBER, H-P ; SCHLEE, D ; SCHOPP, W: *Biochemisches Praktikum*. Gustav Fischer Verlag Jena, 1997 (5). – 11 S.
- [204] BORDUSA, F ; ULLMANN, D ; ELSNER, C ; JAKUBKE, H: Substratmimetica-vermittelte Peptidsynthese: eine Strategie zur spezifitätsunabhängigen, irreversiblen Ligation. In: *Angewandte Chemie* 109 (1997), Jan, S. 2583–2585
- [205] PÖHLMANN, A: *Untersuchungen zur Intein-vermittelten Semisynthese modifizierter Proteine*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., 2006
- [206] GÜNTHER, R: *Untersuchungen zur Protease-katalysierten C-N-Ligation unspezifischer und nicht-codierter Aminosäurederivate sowie nichtpeptidischer Edukte*, Universität Leipzig Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Diplomarbeit, 1998
- [207] MICHAELIS, L ; MENTEN, M: Die Kinetik der Invertinwirkung. In: *Biochemische Zeitschrift* 49 (1913), S. 333–369
- [208] BRIGGS, G ; HALDANE, J: A note on the kinetics of enzyme action. In: *Biochemical journal* 19 (1925), Mar, S. 338–339

- [209] GOUDAR, C ; SONNAD, J ; DUGGLEBY, R: Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1429 (1999), Jan, Nr. 2, S. 377–383
- [210] SCOTT, T ; MANN, R ; MARTINEZ, I ; ROBERTO, E: General relativity and quantum mechanics: towards a generalization of the Lambert  $W$  function A Generalization of the Lambert  $W$  Function. In: *Applicable Algebra in Engineering, Communication and Computing* 17 (2006), April, S. 41–47
- [211] ELSCHENBROICH, C ; HENSEL, F H. ; HOPF, H ; BECHMANN, W (Hrsg.) ; SCHMIDT, J (Hrsg.): *Einstieg in die Physikalische Chemie für Nebenfächler*. Teubner Studienbücher Chemie, 2001 (2). – 109 ff S.
- [212] WILKINSON, A ; FERSHT, A ; BLOW, D ; WINTER, G: Site-directed mutagenesis as a probe of enzyme structure and catalysis: tyrosyl-tRNA synthetase cysteine-35 to glycine-35 mutation. In: *Biochemistry* 22 (1983), Nr. 15, S. 3581–3586
- [213] CAPLOW, M: Chymotrypsin catalysis. Evidence for a new intermediate. In: *Journal of the American Chemical Society* 91 (1969), Nr. 13, S. 3639–3645
- [214] GATTERMANN ; WIELAND (Hrsg.): *Die Praxis des organischen Chemikers*. Walter de Gruyter, 1982
- [215] LARSON, J ; MCMAHON, T: Strong hydrogen bonding in gas-phase anions. An ion cyclotron resonance determination of fluoride binding energetics to Brønsted acids from gas-phase fluoride exchange equilibrium measurements. In: *Journal of the American Chemical Society* 105 (1983), Nr. 10, S. 2944–2950
- [216] EMSLEY, J: Very strong hydrogen bonding. In: *Chemical Society Reviews* 9 (1980), Nr. 1, S. 91–124
- [217] JIANG, L ; LAI, L: CH...O hydrogen bonds at protein-protein interfaces. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 40, S. 37732–37740
- [218] KÖNNECKE, A ; SCHELLENBERGER, V ; HOFMANN, H ; JAKUBKE, H: Die Partitionskonstante als Effizienzparameter von Nucleophilen bei enzymkatalysierten kinetisch kontrollierten Peptidsynthesen. In: *Pharmazie* 39 (1984), S. 785–786
- [219] SCHELLENBERGER, V ; SCHUSTER, M ; JAKUBKE, H: Optimization of Protease-Catalyzed Acyl Transfer Reactions. Determination of the Partition Constant Characterizing Nucleophile Efficiency. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 4 (1990), S. 105–111
- [220] GÜNTHER, R ; STEIN, A ; BORDUSA, F: Investigations on the enzyme specificity of clostripain: A new efficient biocatalyst for the synthesis of peptide isosteres. In: *The Journal of Organic Chemistry* 65 (2000), S. 1672–1679
- [221] BISSWANGER, H: *Enzymkinetik*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999 (3). – 115 ff. S.
- [222] HILL, A: The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. In: *Proceedings of the Physiological* (1910), Nov, Nr. 40, S. IV–VII
- [223] KHOURY, G ; BALIBAN, R ; FLOUDAS, C: Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. In: *Scientific Reports* 1 (2011), Sep, Nr. 90
- [224] WILSON, R ; DOUGLAS, C ; TATTERSALL, R ; REEVES, W: Immunogenicity of highly purified bovine insulin: a comparison with conventional bovine and highly purified human insulins. In: *Diabetologia* 28 (1985), Nr. 9, S. 667–670
- [225] ALBERTS, B: *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 2002. – 760 S.

- [226] KIMBERLY, W ; LAVOIE, M ; OSTASZEWSKI, B ; YE, W ; WOLFE, M ; SELKOE, D: Gamma-Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003), Nr. 11, S. 6382–6387
- [227] RYDEL, T ; RAVICHANDRAN, K ; TULINSKY, A ; BODE, W ; HUBER, R ; ROITSCH, C ; FENTON, J: The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin. In: *Science* (1990), Feb, Nr. 249, S. 270–280
- [228] MACKMAN, N: Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. In: *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 36 (2006), Nr. 2, S. 104–107
- [229] CHELUR, D ; UNAL, O ; SCHOLTYSSEK, M ; STRICKLER, J: Fusion Tags for Protein Expression and Purification. In: *BioPharm International Supplements* (2008), Jun
- [230] HAGEN, J von: *Proteomics Sample Preparation*. VCH-Wiley, 2008
- [231] BUDZIKIEWICZ ; SCHÄFER: *Massenspektrometrie - Eine Einführung*. Wiley-VCH, 2005
- [232] FISCHER, G ; BANG, H ; MECH, C: Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. In: *Biomedica biochimica acta* 43 (1984), Nr. 10, S. 1101–1111
- [233] RAHFELD, J ; RÜCKNAGEL, K ; SCHELBERT, B ; LUDWIG, B ; HACKER, J ; MANN, K ; FISCHER, G: Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. In: *FEBS Letters* 352 (1994), Sep, Nr. 2, S. 180–184
- [234] RAHFELD, J ; SCHIERHORN, A ; MANN, K ; FISCHER, G: A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. In: *FEBS letters* 343 (1994), Jan, S. 65–69
- [235] HEDSTROM, L ; SZILAGYI, L ; RUTTER, W: Converting Trypsin to Chymotrypsin - The Role of Surface Loops. In: *Science* 255 (1992), Mar, Nr. 5049, S. 1249–1253
- [236] PHILLIPS, M ; FLETTERICK, R ; RUTTER, W: Arginine 127 Stabilizes the Transition State in Carboxypeptidase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), Nov, Nr. 33, S. 20692–20698
- [237] CLELAND, J ; CRAIK, C: *Protein Engineering, Principles and Practice*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 1996. – 518 ff S.
- [238] GRUMONT, R ; SIRAWARAPORN, W ; SANTI, D: Heterologous expression of the bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Leishmania major*. In: *Biochemistry* 27 (1988), May, Nr. 10, S. 3776–3784
- [239] BITTER, G ; CHANG, K ; EGAN, K: A multi-component upstream activation sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. In: *Mol Genet* 231 (1991), Dec, Nr. 1, S. 22–32
- [240] WU, D ; HU, M ; CHUNG, B: Expression and functional study of wild-type and mutant human cytochrome P450c21 in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *DNA and Cell Biology* 10 (1991), Apr, Nr. 3, S. 201–209
- [241] MARTINS, N ; SANTORO, M: Partially folded intermediates during trypsinogen denaturation. In: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32 (1999), Jun, Nr. 6, S. 673–682
- [242] SCHMIDT, K: New reptiles and a new salamander from china. In: *The american museum of natural history* (1925), Feb, Nr. 157, S. 1–5
- [243] RAWLINGS, N ; TOLLE, D ; BARRETT, A: Evolutionary families of peptidase inhibitors. In: *Biochemical journal* 378 (2004), Jan, S. 705–716

- [244] KUNITZ, M ; NORTHROP, J: Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. In: *The Journal of general physiology* (1936), Jul, S. 991–1007
- [245] PARRY, M ; JACOB, U ; HUBER, R ; WISNER, A ; BON, C ; BODE, W: The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. In: *Structure* 6 (1998), Nr. 9, S. 1195–1206
- [246] BRAUD, S ; PARRY, M ; MAROUN, R ; BON, C ; WISNER, A: The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Jan, Nr. 3, S. 1823–8
- [247] RENATUS, M ; BODE, W ; HUBER, R ; STÜRZEBECKER, J ; STUBBS, M: Structural and functional analyses of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: implications for the inhibition of factor Xa, tPA, and urokinase. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 41 (1998), Aug, S. 5445–5456
- [248] TONIOLO, C: Intramolecularly hydrogen-bonded peptide conformations. In: *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 9 (1980), Oct, Nr. 1, S. 1–44
- [249] ZAKHAROVA, E ; HORVATH, M ; GOLDENBERG, D: Structure of a serine protease poised to resynthesize a peptide bond. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), Nr. 27, S. 11034–11039
- [250] MU, Y ; LIN, J ; LIU, R: Interaction of Sodium benzoate with trypsin by spectroscopic techniques. In: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 83 (2011), S. 130–135
- [251] BARET, P ; ANGELOFF, A ; ROUCH, C ; PABION, M ; CADET, F: Microquantification of proteins by spectrophotometry. part 1: from 190 nm to 1100 nm, selection of wavelengths. In: *Spectroscopy letters* 30 (1997), Nr. 6, S. 1067–1088
- [252] DAVIE, E ; NEURATH, H: Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. In: *Journal of Biological Chemistry* 212 (1955), Jan, S. 515–530
- [253] PERUTZ, M ; RAIDT, H: Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2. In: *Nature* 255 (1975), S. 256–259
- [254] KUMAR, S ; NUSSINOV, R: Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins. In: *ChemBioChem* 3 (2002), Nr. 7, S. 604–617. – ISSN 1439–7633
- [255] HOROVITZ, A ; SERRANO, L ; AVRON, B ; BYCROFT, M ; FERSHT, A: Strength and co-operativity of contributions of surface salt bridges to protein stability. In: *Journal of Molecular Biology* 216 (1990), Nr. 4, S. 1031 – 1044
- [256] KOSSIAKOFF, A ; CHAMBERS, J ; KAY, L ; STROUD, R: Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolution. In: *Biochemistry* 16 (1977), Nr. 4, S. 654–664
- [257] FREER, S ; KRAUT, J ; ROBERTUS, J ; WRIGHT, H: Chymotrypsinogen: 2, 5-Å crystal structure, comparison with  $\alpha$ -chymotrypsin, and implications for zymogen activation. In: *Biochemistry* 9 (1970), Nr. 9, S. 1997–2009
- [258] HUBER, R ; BODE, W: Structural basis of the activation and action of trypsin. In: *Accounts of Chemical Research* 11 (1978), Nr. 3, S. 114–122
- [259] ROBILLARD, G ; SHULMAN, R: High resolution nuclear magnetic resonance studies of the active site of chymotrypsin: I. The hydrogen bonded protons of the "charge relay" system. In: *Journal of Molecular Biology* 86 (1974), Nr. 3, S. 519–540
- [260] SCHEINER, S ; KLEIER, D ; LIPSCOMB, W: Molecular orbital studies of enzyme activity: I: Charge relay system and tetrahedral intermediate in acylation of serine proteinases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (1975), Nr. 7, S. 2606–2610

- [261] MARQUART, M ; WALTER, J ; DEISENHOFER, J ; BODE, W ; HUBER, R: The geometry of the reactive site and of the peptide groups in trypsin, trypsinogen and its complexes with inhibitors. In: *Acta Crystallographica Section B: Structural Science* 39 (1983), Nr. 4, S. 480–490
- [262] SCHEIDIG, A ; HYNES, T ; PELLETIER, L ; WELLS, J ; KOSSIAKOFF, A: Crystal structures of bovine chymotrypsin and trypsin complexed to the inhibitor domain of alzheimer's amyloid beta-protein precursor (APPI) and basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): Engineering of inhibitors with altered specificities. In: *Protein science* 6 (1997), Nr. 9, S. 1806–1824
- [263] FASMAN, G ; FOSTER, R ; BEYCHOK, S: The conformational transition associated with the activation of chymotrypsinogen to chymotrypsin. In: *Journal of Molecular Biology* 19 (2009), May, Nr. 2, S. 240–253
- [264] SCHMIDT, A ; SUN, M ; OGAWA, T ; BAJAJ, S ; GAILANI, D: Functional Role of Residue 193 (Chymotrypsin Numbering) in Serine Proteases: Influence of Side Chain Length and  $\beta$ -Branching on the Catalytic Activity of Blood Coagulation Factor XIa. In: *Biochemistry* 47 (2008), Nr. 5, S. 1326–1335
- [265] FISCHER, G: Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases and Their Effectors. In: *Angewandte Chemie International Edition in English* 33 (1994), Jan, Nr. 14, S. 1415–1436
- [266] VOROB'EV, M ; DALGALARRONDO, M ; CHOBERT, J ; HAERTLÉ, T: Kinetics of beta-casein hydrolysis by wild-type and engineered trypsin. In: *Biopolymers* 54 (2000), Nr. 5, S. 355–364
- [267] WATANABE, T ; OGASAWARA, N ; GOTO, H ; YAMADA, Y: Three trypsinogens from rat pancreas. In: *FEBS Letters* 121 (1980), Oct, Nr. 2, S. 369–371
- [268] COLOMB, E ; GUY, O ; DEPREZ, P ; MICHEL, R ; FIGARELLA, C: The two human Trypsinogens: catalytic properties of the corresponding trypsins. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 525 (1978), Nr. 1, S. 186–193
- [269] KOPETZKI, E ; HOPFNER, K ; BODE, W ; HUBER, R: *Autocatalytically activatable zymogenic precursors of proteases and their use*. Patent Application, 11 2003. – US 2003/0207402 A1
- [270] BAIRD, T ; WRIGHT, W ; CRAIK, C: Conversion of trypsin to a functional threonine protease. In: *Protein science* 15 (2006), Mar, S. 1229–1238
- [271] LIU, L ; MUSERO, N ; HEDSTROM, L ; GERSHENSON, A: Conformational distributions of protease-Serpion Complexes: A partially translocated complex. In: *Biochemistry* 45 (2006), S. 10865–10872
- [272] NIE, X ; TANG, J: RGD-Containing trypsin with both platelet aggregation inhibitory activity and proteolytic activity. In: *Biochemistry and Molecular biology international* 45 (1998), Sep, Nr. 5, S. 1149–1154
- [273] LI, X ; TANG, J ; ZHANG, L: Autolytic site mutant R105C of rat trypsin. In: *Biochemistry and Molecular biology international* 42 (1997), Nr. 5, S. 991–996
- [274] Kapitel 21. In: SORRELL, T: *Organic Chemistry*. 2. University Science Books, 2005, S. 701–731
- [275] SCHUSTER, M ; MEDVEDKIN, V ; SCHELLENBERGER, V ; MITIN, Y ; JAKUBKE, H: Synthesis and kinetic characterisation of omega-guanidinocarbonic acid ethyl esters as trypsin substrates. In: *Biomedica biochimica acta* 49 (1990), Nr. 6, S. 519–521
- [276] SCHELLENBERGER, V ; JAKUBKE, H ; ZAPEVALOVA, N ; MITIN, Y: Protease-Catalyzed Peptide-Synthesis using Inverse Substrates: The influence of reaction conditions on the trypsin acyl transfer efficiency. In: *Biotechnology and Bioengineering* 38 (1991), S. 104–108
- [277] PECH, A: *Einsatz nativer Proteasen zur stereoselektiven Synthese von L- und D- konfigurierten Proteinen*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., 2011

- [278] FOUCAULT, G ; SEYDOUX, F ; YON, J: Comparative Kinetic properties of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\psi$  forms of trypsin. In: *European Journal of Biochemistry* 47 (1974), Nr. 2, S. 295–302
- [279] JEFFREY, G.A.: *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, 1997 (Topics in Physical Chemistry Series)
- [280] GILLI, G ; GILLI, P: *The Nature of the Hydrogen Bond: Outline of a Comprehensive Hydrogen Bond Theory*. OUP Oxford, 2009 (IUCr monographs on crystallography). – ISBN 9780199558964
- [281] THONDORF, I: *Vergleiche von Kristallstrukturen*. Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Okt 2012
- [282] RADISKY, E ; LEE, J ; LU, C ; KOSHLAND, D: Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Mar, Nr. 18, S. 6835–6840
- [283] WHITING, A ; PETICOLAS, W: Details of the acyl-enzyme intermediate and the oxyanion hole in serine protease catalysis. In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 2, S. 552–561
- [284] GRZESIAK, A ; HELLAND, R ; SMALAS, A ; KROWARSCHEK, D ; DADLEZ, M ; OTLEWSKI, J: Substitutions at the P1' position in BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases. In: *Journal of Molecular Biology* 301 (2000), Nr. 1, S. 205 – 217
- [285] KATZ, B ; FINER-MOORE, J ; MORTEZAEI, R ; RICH, D ; STROUD, R: Episelection: Novel Ki Binding or Chemistry on an Enzyme Surface. In: *Biochemistry* 34 (1995), Mar, S. 8264–8280
- [286] KOSSIAKOFF, A: Use of the neutron diffraction-H/D exchange technique to determine the conformational dynamics of trypsin. In: *Basic Life Science* 27 (1984), S. 281–304
- [287] FINER-MOORE, J ; KOSSIAKOFF, A ; HURLEY, J ; EARNEST, T ; STROUD, R: Solvent Structure in Crystals of Trypsin Determined by X-Ray and Neutron Diffraction. In: *Proteins* 12 (1992), S. 203–222
- [288] JENCKS, W ; CARRIUOLO, J: General base catalysis of the aminolysis of phenyl acetate. In: *Journal of the American Chemical Society* 82 (1960), Feb, Nr. 3, S. 675–681
- [289] JENCKS, W ; CARRIUOLO, J: Reactivity of nucleophilic reagent toward esters. In: *Journal of the American Chemical Society* 82 (1960), Apr, Nr. 7, S. 1778–1786
- [290] HENDERSON, R: Structure of crystalline  $\alpha$ -chymotrypsin\* 1: IV. The structure of indoleacryloyl- $\alpha$ -chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. In: *Journal of Molecular Biology* 54 (1970), Jul, S. 341–354
- [291] FERSHT, A: *Enzyme structure and mechanism*. San Francisco: W.H. Freeman, 1985. – 50–52 S.
- [292] JENCKS, W: *Catalysis in chemistry and enzymology*. Mineola, N.Y: Dover, 1987
- [293] SIMON, L ; GOODMAN, J: Hydrogen-bond stabilization in oxyanion holes: grand jeté to three dimensions. In: *Organic & Biomolecular Chemistry* 10 (2012), S. 1905–1913
- [294] KOSHLAND, D: Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44 (1958), Nr. 2, S. 98–104
- [295] WARSHEL, A ; SHARMA, P ; KATO, M ; XIANG, Y ; LIU, H ; OLSSON, M: Electrostatic basis for enzyme catalysis. In: *Chemical Reviews* 106 (2006), S. 3210–3235
- [296] TONGE, P ; CAREY, P: Direct observation of the titration of substrate carbonyl groups in the active site of  $\alpha$ -chymotrypsin by resonance Raman spectroscopy. In: *Biochemistry* 28 (1989), Nr. 16, S. 6701–6709

- [297] CAREY, P ; TONGE, P: Chemistry of enzyme-substrate complexes revealed by resonance Raman spectroscopy. In: *Chemical Society Reviews* 19 (1990), S. 293-316
- [298] TONGE, P ; PUSZTAI, M ; WHITE, A ; WHARTON, C ; CAREY, P: Resonance Raman and Fourier transform infrared spectroscopic studies of the acyl carbonyl group in [3-(5-methyl-2-thienyl)acryloyl]chymotrypsin: evidence for artifacts in the spectra obtained by both techniques. In: *Biochemistry* 30 (1991), Nr. 19, S. 4790-4795
- [299] WHITE, A ; WHARTON, C: Hydrogen-bonding in enzym catalysis. In: *Biochemical journal* (1990), Nr. 270, S. 627-637
- [300] *Chemical Reaction. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2.* M Nic and J Jirat and B Kosata, 2006
- [301] *Kapitel 15.* In: VOET, D ; VOET, J: *Biochemistry.* 3. Wiley John Wiley and Sons, Inc., 2004, S. 517
- [302] KURTH, T ; ULLMANN, D ; JAKUBKE, H ; HEDSTROM, L: Converting Trypsin to Chymotrypsin: Structural Determinants of S1' Specificity. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 33, S. 10098-10104
- [303] GUPTON, B ; CARROLL, D ; TUHY, P ; KAM, C ; POWERS, J: Reaction of azapeptides with chymotrypsin-like enzymes. New inhibitors and active site titrants for chymotrypsin A<sub>n</sub>, subtilisin BPN', subtilisin Carlsberg, and human leukocyte cathepsin G. In: *Journal of Biological Chemistry* 259 (1984), Apr, Nr. 7, S. 4279-4287
- [304] ROBILLARD, T ; POWERS, J ; WILCOX, P: Chemical and crystallographic study of carbamoyl-chymotrypsin A. In: *Biochemistry* 11 (1972), Nr. 10, S. 1773-1784
- [305] SYRÉN, P ; HENDIL-FORSSELL, P ; AUMAILLEY, L ; BESENMATTER, W ; GOUNINE, F ; SVENDSEN, A ; MARTINELLE, M ; HULT, K: Esterases with an Introduced Amidase-Like Hydrogen Bond in the Transition State Have Increased Amidase Specificity. In: *ChemBioChem* 13 (2012), Nr. 5, S. 645-648
- [306] SYRÉN, P-O ; HULT, K: Amidases have a hydrogen bond that Facilitates Nitrogen inversion, but Esterases have not. In: *ChemCatChem* 3 (2011), S. 853-860
- [307] KURTH, T ; ; GRAHN, S ; THORMANN, M ; ULLMANN, D ; HOFMANN, H ; JAKUBKE, H ; HEDSTROM, L: Engineering the S1' subsite of trypsin: design of a protease which cleaves between dibasic residues. In: *Biochemistry* 37 (1998), Apr, S. 11434-11440
- [308] BECKERT, R (Hrsg.) ; FANGHÄNEL, E (Hrsg.) ; HABICHER, W (Hrsg.) ; METZ, P (Hrsg.) ; PAVEL, D (Hrsg.) ; SCHWETLICK, K (Hrsg.): *Organikum Organisch-chemisches Grundpraktikum.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004 (22). - 214-215 S.
- [309] *Kapitel 6.* In: POLGÁR, L: *Mechanims of Protease Action.* CRCPress, 1989, S. 107-109
- [310] *Kapitel 15.* In: SYRÉN, P-O: *Understanding Enzymes.* Pan Stanford Publishing, 2016, S. 523-558
- [311] WEHOFSKY, N ; BORDUSA, F: Programming of enzyme specificity by substrate mimetics: investigations on the Glu-specific V8 protease reveals a novel general principle of biocatalysis. In: *FEBS Letters* 443 (1999), Nr. 2, S. 220-224
- [312] THUST, S: *Anwendungen des Substratmimetika-Konzeptes für den Protease-katalysierten Einbau unspezifischer und nichtnatürlicher Aminosäuren in Peptide,* Universität Leipzig Fakultät für Biowissenschaften, Diss., 2002
- [313] LEVARY, D ; PARTHASARATHY, R ; BODER, E ; ACKERMAN, M: Protein-Protein Fusion Catalyzed by Sortase A. In: *PloS one* 6 (2011), Apr, Nr. 4, S. e18342
- [314] POPP, M W. ; PLOEGH, H L.: Making and breaking peptide bonds: protein engineering using sortase. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 50 (2011), May, Nr. 22, S. 5024-32

- [315] KENT, S: Chemical synthesis of peptides and proteins. In: *Annual review of biochemistry* 57 (1988), S. 957–989
- [316] XU, Shaojun ; RALL, K ; BORDUSA, F: Enzymatic Coupling of Specific Peptides at Nonspecific Ligation Sites: Effect of Asp189Glu Mutation in Trypsin on Substrate Mimetic-Mediated Reactions. In: *Journal of organic chemistry* 66 (2001), Oct, Nr. 5, S. 1627–1632
- [317] GRODBERG, J ; DUNN, J: ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. In: *Journal of Bacteriology* 170 (1988), Nr. 3, S. 1245–1253
- [318] MESELSON, M ; YUAN, R: DNA Restriction Enzyme From E.coli. In: *Nature* 217 (1968), Mar, S. 1110–1114
- [319] NICHOLLS, R: Direct cloning in plasmid libraries after fragment enrichment. In: *focus* 8 (1986), May, Nr. 2, S. 9
- [320] HANAHAH, D: Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. In: *Journal of Molecular Biology* 166 (1983), Jan, S. 557–580
- [321] BERTANI, G: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. In: *Studies on Lysogenesis* 62 (1951), May, S. 293–300
- [322] AUSUBEL, F ; BRENT, R ; KINGSTON, R ; MOORE, D. ; SEIDMAN, J ; SMITH, J ; STRUH, K: *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, 1993
- [323] MURTHY, M ; RAO, B ; REDDY, N ; SUBRAHMANYAMAND, P ; MADHVANATH, U: Non-equivalence of yepd and synthetic complete media in yeast reversion studies. In: *Mutation Research* 27 (1975), Apr, S. 219–223
- [324] BODANSZKY, M: Catalysis in peptide synthesis. In: *Journal of Protein Chemistry* 4 (1985), Nr. 2, S. 69–86
- [325] LEBEDEV, A ; LEBEDEVA, A ; SHELDYAKOV, V ; SHATUNOV, V ; OVCHARUK, S: Organosilicon synthesis of isocyanates: IV. Synthesis of isocyanates from aliphatic and alkylaromatic amino acid esters. In: *Russian Journal of General Chemistry* 77 (2007), Oct, Nr. 4, S. 581–585
- [326] RAPLEY, P: *The Nucleic Acid Protocols - Handbook*. Humana Press, 1999
- [327] KUNKEL, T A.: The mutational specificity of DNA polymerases- $\alpha$  and - $\gamma$  during in vitro DNA synthesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 260 (1985), Oct, Nr. 23, S. 12866–12874
- [328] BEGGS, J: Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. In: *Nature* 275 (1978), Sep, Nr. 5676, S. 104–109
- [329] BRADFORD, M: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), Oct, S. 248–254
- [330] MERRIL, C: Gel Straining Techniques. In: *Methods in Enzymology* 182 (1990), S. 477–488
- [331] WALTER, O ; CHRISTIAN, W: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. In: *Die Naturwissenschaften*. 29 (1941), Nr. 39, S. 589–590
- [332] GILL, S ; HIPPEL, P von: Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. In: *Analytical biochemistry* 182 (1989), Nov, Nr. 2, S. 319–326
- [333] PETERSON, L ; SOKOLOVSKY, M ; VALLEE, B: Purification and crystallization of human carboxypeptidase A. In: *Biochemistry* 15 (1976), Jun, Nr. 12, S. 2501–2508

- [334] REECK, G ; WALSH, K ; NEURATH, H: Isolation and characterization of carboxypeptidases A and B from activated pancreatic juice. In: *Biochemistry* 10 (1971), Dec, Nr. 25, S. 4690–4698
- [335] WU, C ; ROBERTSON, D ; HUBBARD, S ; GASKELL, S ; BEYNON, R: Proteolysis of native proteins - Trapping of a reaction intermediate. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 2, S. 1108–1115
- [336] PEREZ-IRATXETA, C ; ANDRADE-NAVARRO, M: K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. In: *BMC Structural Biology* 8 (2008), Nr. 1, S. 25. – ISSN 1472–6807
- [337] TANAKA, T ; MGRAE, B ; CHO, K ; COOK, R ; FRAKI, J ; JOHNSON, D ; POWERS, J: Mammalian tissue trypsin-like enzymes. Comparative reactivities of human skin tryptase, human lung tryptase, and bovine trypsin with peptide 4-nitroanilide and thioester substrates. In: *Journal of Biological Chemistry* 258 (1983), Nr. 22, S. 13552–13557
- [338] LOPES, A ; JULIANO, M ; MARANA, S ; JULIANO, L ; TERRA, W: Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (2006), Feb, Nr. 2, S. 130–140
- [339] NOSSAL, N ; HEPPEL, L: The Release of Enzymes by Osmotic Shock from *Escherichia coli* in Exponential Phase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 241 (1966), Nr. 13, S. 3055–3062
- [340] RATHORE, A ; BILBREY, R ; STEINMEYER, D: Optimization of an osmotic shock procedure for isolation of a protein product expressed in *E. coli*. In: *Biotechnology Progress* 19 (2003), Jan, S. 1541–1546

# Anhang

# Material und Methoden

# A Material

## A.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien in p. a. Qualität wurden von den Firmen BD (Heidelberg), BIOLINE (Luckenwalde), OPC ORPEGEN Peptide Chemical GmbH (Heidelberg), IRIS Biotech GmbH (Marktredwitz), Bio-Rad (Hercules, CA), Difco (Detroit, USA), Duchefa Biochemie (Brüssel), Fluka BioChemika (Buchs), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Dreisenhofen) bezogen.

Ester, Peptide und Substratmimetika, welche nicht kommerziell erwerblich sind, entstammen der Stammsammlung der Arbeitsgruppe und wurden vor ihrer Verwendung chromatographisch und massenspektrometrisch untersucht (siehe Abschnitt B.3.6 und Tabelle C.1).

## A.2 Enzyme

Folgende Enzyme wurden von den entsprechenden Firmen verwendet:

**Tabelle A.1** Enzyme

Enzym	Herkunft
Taq DNA Polymerase (recombinant)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase	NEB BioLabs (Frankfurt am Main)
Pfu DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>SaII</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>BamHI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>DpnI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
Clostripain	Worthington Biochemical Corp. (Lakewood)
Trypsin from bovine pancreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Enterokinase from calf intestine	Roche (Mannheim)

## A.3 Molekularbiologische Kits

**Tabelle A.3** Molekularbiologische Kits

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Isolation von Plasmid-DNA (Miniprep)	High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
Reinigung von DNA-Fragmenten	High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
Reinigung von DNA-Fragmenten	Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Erzeugen kompetenter Hefezellen	Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit™	Zymo Research

## A.4 Längenstandard/Molekülmassenstandard

**Tabelle A.5** Längenstandard und Molekülmassenstandard

Art	Bezeichnung	Herkunft
DNA Längenstandard	1 kB DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
Molekülmassenstandard	PageRuler™	Fermentas (St. Leon Rot)

## A.5 Stämme

**Tabelle A.7** Stämme

Bezeichnung	Stamm	Resistenz/Genotyp	Referenz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DLM 101α	<i>Mat a, leu 2-3,-112 his2 3-11,-15 can1, ura 3D, pep4D,[cir<sup>ρ</sup>], DM23</i>	[88, 236, 316]
<i>Escherichia coli</i>	BL21	F <sup>-</sup> , <i>dcm, ompT, hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )	[317]
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	Nalidixinsäure/ <i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1</i>	[318-320]

## A.6 Nukleotide und Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG GmbH (Erlsberg) und die Desoxyribonukleotide wurden von Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen.

**Tabelle A.9** Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' →3')
Q192P-rev	AGG ATT CCT GCC CGG GTG AC
Q192P-for	CCT GCC CGG GTG ACT CTG GTG GCC C
G193P-rev	GGG CCA CCA GAG TCA GGC TGG CAG G
G193P-for	CCT GCC AGC CTG ACT CTG GTG GCC C
D194P-rev	GGG CCA CCA GAG GGA CCC TGG CAG
D194P-for	CCT GCC AGG GTC CCT CTG GTG GCC C
Q192P/G193P-rev	GGG CCA CCA GAG TCA GGC GGG CAG GAA TCC
Q192P/G193P-for	GGC AAG GAT TCC TGC CCG CCT GAC TCT GGT GGC CC
G193P/D194P-rev	GGG CCA CCA GAG GGA GGC TGG CAG GAA TCC
G193P/D194P-for	GGA TTC CTG CCA GCC TCC CTGC TGG TGG CCC
Q192P/D194P-rev	GGC AAG GAT TCC TGC CCG GGT CCC TCT GGT GG
Q192P/D194P-for	CCA CCA GAG GGA CCC GGG CAG GAA TCC TTG CC
pYT-rev	GGA GCA CTG TCC GAC CGC
Tryp-for	ATG GTA TGG CCA TCG TTG GAG GAT ACA CCT GCC AAG
T7	TTA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7-term	CTA GTT ATT GCT CAG CGG T

## A.7 Vektoren

**Tabelle A.11** Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Referenz
pST	Amp <sup>R</sup>	[88, 316]
pET28a	Kan <sup>R</sup>	Novagen
pET26a::pelB::MAPar10	Kan <sup>R</sup>	Novagen, Dr. Sandra Liebscher
pYT	Amp <sup>R</sup> , leu, ura	[235, 236]

## A.8 Kulturmedien

**Tabelle A.13** Medien zur Mikroorganismenkultur

Spezies	Medium	Rezept	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	LB	1 % (w/v) Bakto-Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt pH 7,5	[321]
	Festmedium	+ 1,2 % (w/v) Bakto-Agar	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YEPD oder YPD	1 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 2 % (w/v) Saccharose; 2 % (w/v) Bakto-Pepton	
	Festmedium	+ 1,2 % (w/v) Bakto-Agar	[322]
	SC-Leu	6,6 g Hefe-Stickstoffbase, 1,3 g ura-leu defi- zientes Medium, 80 g Glucose, 24 mg Uracil	[323]
	Festmedium	+ 1,2 % (w/v) Bakto-Agar	
	SC-Ura	6,6 g Hefe-Stickstoffbase, 1,3 g ura-leu defi- zientes Medium, 80 g Glucose, 36 mg Leu- cin	[323]
	Festmedium	1,2 % (w/v) Bakto-Agar	

## A.9 Antibiotika

**Tabelle A.15** Antibiotika

Antibiotikum	Resistenz	Stammlösung (mg l <sup>-1</sup> )	Arbeitskonzentration (µg ml <sup>-1</sup> )	Herkunft
Ampicillin	Amp <sup>R</sup>	100	100	Serva (Heidelberg)
Nalidixinsäure	Nal <sup>R</sup>	200	30-90	Serva (Heidelberg)
Kanamycin	Kan <sup>R</sup>	100	50	Serva (Heidelberg)

## A.10 Geräte und Zubehör

**Tabelle A.17** Verwendete Geräte und Zubehör

Geräte/Zubehör	Verwendung	Hersteller
Micromass ZQ	Massenspektrometer	Waters (Eschborn)
ACQUITY UPLC®System	<i>Ultra Performance Chromatography</i> (UPLC)	Waters (Eschborn)
ACQUITY UPLC®BEH 130 C18 1,7 µm 2,1 x 100 mm	UPLC-Säule	Waters (Eschborn)
Breeze HPLC™	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	Waters (Eschborn)
VYDAC® Protein & Peptide C18	HPLC-Säule	Grace (Albany)
Jasco J-810	CD-Spektrometer	Jasco (Gross-Umstadt)
Jasco Scinco S-3100	UV/Vis-Spektrometer	Jasco (Gross-Umstadt)
Primus HT	PCR-Maschine	Clemens (Waldbuettelbrunn)
Beckman Coulter Alegra®X-15R Centrifuge	Zentrifuge	Beckman (Krefeld)
Beckman Coulter SX 4750A	Zentrifugenrotor	Beckman (Krefeld)
Äkta Prime Plus	Niederdruckchromatographie	GE Healthcare (Upsala)
HiTrap™ Benzamidin FF(HS)	Affinitätschromatographiesäule	GE Healthcare (Upsala)
Biocad Sprint E700	Perfusionschromatographie	Applied Biosystems (Foster City)
POROS HQ-20	Anionenaustauscher (Säulenmaterial)	Applied Biosystems (Foster City)
Toyop pearl 650M	Kationentauscher (Säule)	Supelco (Sigma-Aldrich (Dreisenhofen))
Mini-PROTEAN <sup>R</sup> -Tetra-System	Gel-Apparatur	Biorad (München)
Thermomixer comfort	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)

## A.11 Datenverarbeitung

### Software

**Tabelle A.19** Software

Software	Anwendung
Serial Cloner 2.1	Umwandlung von DNS- in Proteinsequenz, Genkarten, Sequenzanalyse, Primerdesign
Gentle 1.9.4	Umwandlung von DNS- in Proteinsequenz, Genkarten, Sequenzanalyse, Primerdesign
Sketch	Chemische Formeln
marvin	Chemische Formeln
4 Peaks	DNS-Sequenzanalyse
EnzymeX 3	Restriktionsendonukleasensuche
mMass	Massenspektrometrie
Breeze 3.3	Chromatographie
swiss pdb viewer/ Deep view 4.0.1	pdb-Betrachter und Molekülbearbeitung
qtiplot 0.9.8.6	Datenauswertung
Papers (Version 1.9.7 )	Literaturrecherche und -verwaltung
BibDesk (Version 1.5.4)	Literaturrecherche und -verwaltung
LabPro Plus 4.10.1	UV/Vis-Spektren
Spectra Analysis 1.53.01	CD-Spektren
MaxEnt	Algorithmus zum Extrapolieren von Massenspektren
clustalx	Sequenzvergleiche
PSIPRED	Berechnung von Sekundärstrukturelementen aus der Aminösäuresequenz
Jasco Secondary- Structure Estimation	Berechnung von Sekundärstrukturelementen aus den CD-Spektren
K2D2	Berechnung von Sekundärstrukturelementen aus den CD-Spektren

### Internetseiten

**Tabelle A.21** Verwendete Internetseiten

Internetseite	Anwendung
<a href="http://www.pdb.org/">http://www.pdb.org/</a>	Strukturdatenbank
<a href="http://www.brenda-enzymes.info/">http://www.brenda-enzymes.info/</a>	Enzymdatenbank
<a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>	Analyse von Proteinsequenzen

# B Methoden

## B.1 Chemische Synthesen

### B.1.1 Darstellung von Aminosäureestern der allgemeinen Struktur Bz-Xaa-OMe

Die Darstellung der Aminosäureester der Struktur Bz-Xaa-OMe erfolgte nach den Methoden der gemischten Anhydride [324]. Hierzu wurden 1 mmol Benzoesäure in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und bei -15 °C für 30 min unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden je 1,1 mmol DIPEA und CAIBE in vorgekühlter Form unter Rühren zugegeben, worauf sich ein weißer Niederschlag bildete. Nach 10 min Rühren wurden 1,1 mmol Aminosäurekomponente, gelöst in 5 ml Tetrahydrofuran, vom Typ eines Aminosäure-Methylesters, durch Tropfen innerhalb von 15 min zugegeben. Es wurden je weitere 60 min auf Eis und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde je dreimal mit 1 M HCl, 5 %iger  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und *aqua bidest* gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Verbindungen wurden aus DCM/Diethylether umkristallisiert, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

### B.1.2 Darstellung der Verbindungen Z-K-S-Me, Z-K-O-Me und Z-K-NH-Me

Die Darstellung der Aminosäureester der Struktur Z-K-X-Me erfolgte nach den Methoden der gemischten Anhydride [324]. Hierzu wurden 1 mmol Z-K(Boc)-OH in trockenem Tetrahydrofuran gelöst und bei -15 °C für 30 min unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden je 1,1 mmol DIPEA und CAIBE in vorgekühlter Form unter Rühren zugegeben, worauf sich ein weißer Niederschlag bildete. Nach 10 min Rühren wurden 1,1 mmol nukleophile Komponente, gelöst oder als Emulsion in 5 ml Tetrahydrofuran durch Tropfen innerhalb von 15 min zugegeben. Die nukleophile Komponente stellten dabei Methanol, Natriummethanthiolat oder Aminomethan dar. Es wurden je weitere 60 min auf Eis und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde je dreimal mit 1 M HCl, 5 %iger  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und *aqua bidest* gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Verbindungen wurden aus Essigester/Diethylether umkristallisiert, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte in 5 ml 95 % Trifluoressigsäure für 1 h bei RT. Nach dem Entfernen der Trifluoressigsäure im Vakuum wurde der ölig braune Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Petrolether umkristallisiert, getrocknet und aus Wasser lyophilisiert.

### B.1.3 Darstellung des Aminosäureesters der Struktur Bz-G-OGp

Die Synthese des Benzoyl-Glycyl-Guanidinophenylesters erfolgte analog zur Synthese unter B.1.2. Hierzu wurde 1 mmol Hippursäure in trockenem THF gelöst und bei -15 °C für 30 min unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden 1,1 mmol DIPEA und CAIBE in vorgekühlter Form unter Rühren zugegeben, worauf sich ein weißer Niederschlag bildete. Nach 10 min Rühren wurden 1,1 mmol *di*-Boc-geschütztes Guanidinophenyl, dieses wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Pech zur Verfügung gestellt, gelöst in 10 ml Tetrahydrofuran durch Tropfen innerhalb von 15 min zugegeben. Es wurden je weitere 60 min auf Eis und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde je dreimal mit 1 M HCl, 5 %iger KHCO<sub>3</sub>-Lösung und *aqua bidest* gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Verbindungen wurden aus Essigester/Diethylether umkristallisiert, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte in 5 ml 95 % Trifluoressigsäure für 1 h bei RT. Nach dem Entfernen der Trifluoressigsäure im Vakuum wurde der ölig braune Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Petrolether umkristallisiert, getrocknet und aus Wasser lyophilisiert.

### B.1.4 Darstellung der Peptide der allgemeinen Struktur vom Typ MAA-Xaa-AG und MAAAG

Die Peptide vom Typ MAA-Xaa-AG und MAAAG wurden nach den Standardmethoden der Fmoc-Synthese an der Festphase am 2-Chlorotrityl-Harz durchgeführt [13, 15, 16]. Hierzu wurden 125 µmol Fmoc-geschütztes Glycin mit 1 äquivalent DIPEA in 5 ml Dichlormethan gelöst und für 2 h bei RT mit 170 mg eines mit 1,5 mmol beladenen 2-Chlorotrityl-Harzes umgesetzt. Anschließend erfolgten je drei Waschschrte mit 8 ml 17:2:1 Dichlormethan/Methanol/DIPEA, Dichlormethan und DMF. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte für je dreimal für 7 min mit 2 % DBU, 2 % Piperidin in DMF, es wurde anschließend dreimal mit DMF gewaschen.

Die Verlängerung der Sequenz erfolgte zyklisch. Der erste Schritt stellte jeweils die Verlängerung der Sequenz um eine Aminosäure dar. Es wurden jeweils 500 µmol der geschützten Aminosäure mit je einem äquivalent DIPEA und HCTU aktiviert und für 1 h am Harz gekuppelt. Es folgten drei Waschschrte mit DMF. Den zweiten Schritt stellte das Entschützen des *N*-Terminus von der Fmoc-Gruppe dar. Dies erfolgte je dreimal für 7 min mit 2 % DBU, 2 % Piperidin in DMF. Anschließend wurde dreimal mit DMF gewaschen und der Zyklus begann von neuem bis zum Erreichen der vollständigen Sequenz.

Das Abspalten vom Harz und Entschützen der Seitenkettenfunktionen gelang mit 10 ml 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H<sub>2</sub>O für 2 h bei RT. Der Ansatz wurde im Vakuum auf 3 ml eingengt, mit 30 ml eiskaltem Ether gefällt und in 3 ml Essigester aufgenommen und mit *n*-Hexan umkristallisiert. Es erfolgte abschließend die Aufnahme in Wasser, aus dem es lyophilisiert wurde.

### B.1.5 Darstellung der Peptidester FAM-AAK-S-Me und Abz-AAK-OMe

Für die Synthese dieser Ester wurde zunächst die Peptidsequenz AAK als Grundkörper analog zu der Synthese unter Punkt B.1.4 durchgeführt. Dabei wurde Fmoc-Lys(Boc)-OH eingesetzt. Nach Abspalten der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe von der Sequenz AAK und Waschen mit DMF erfolgte jeweils die Umsetzung mit 5/6-Carboxyfluorescein (5/6-FAM) oder Aminobenzoesäure (Abz).

Die Modifizierung mit Carboxyfluorescein erfolgt unter Verwendung des Succinimidester-aktivierten Derivates. Hierfür wurde 1,1 äquivalenten 5/6-Carboxyfluorescein-Succinimidester und 1,1 äquivalente DIPEA in 8 ml DMF gelöst, mit dem sich am Harz befindlichen Peptid für 2 h bei RT umgesetzt. Es erfolgten je drei Waschschrte mit DMF und Dichlormethan.

Die Einführung der Aminobenzoesäure erfolgt analog zu den Standardmethoden der Fmoc-Aminosäuren und wurde entsprechend diesen eingeführt (siehe B.1.4). Hierfür wurde Boc-geschützte Aminobenzoesäure verwendet.

Die Abspaltung vom Harz erfolgte dreimal für 1 h mit 10 ml 1:4 TFE/Dichlormethan bei RT. Nach Einengen auf 5 ml erfolgten das Fälln mit 45 ml eiskalten Ether, Abzentrifugieren und zwei weitere Waschschrte mit eiskaltem Ether.

Die Umsetzung zum Thioester und die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der Synthese unter B.1.2. Hierfür wurde entweder Natriummethanthiolat oder trockenes Methanol verwendet.

Die Umsetzung zum Oxoester erfolgte nach vollständigem Deblockieren, wie unter B.1.2, mit Trimethylsilylchlorid nach der Methode von LEBEDEV [325] in trockenem Methanol für 24 h bei RT.

## B.2 Molekularbiologische Methoden

Für den Umgang mit DNA und Bakterien wurden Standardmethoden nach SAMBROCK [158] und RAPLEY [326] verwendet.

Mutationen wurde nach der Methode von KUNKEL in die entsprechenden Gene im pST-Vektor eingeführt [327]. Dieser wurde in DH5 $\alpha$  transformiert, selektiert und aus einer Übernackkultur isoliert. Der isolierte Vektor wurde mit Endonukleasen umgesetzt und nach einer Reinigung der entstandenen Fragmente in den pET28a-Vektor kloniert. Dieser wurde wiederum transformiert. Nach Selektion und Isolation des Vektors erfolgte eine Umklonierung in den pYT-Vektor. Dieser wurde durch Sequenzierung (Eurofins MWG GmbH (Erlsberg)) auf seine Korrektheit überprüft. Anschließend wurde der pYT-Vektor in DLM 101 $\alpha$ -Zellen transformiert [328] und mittels SC-Ura<sup>r</sup> bzw. SC-Leu<sup>r</sup> selektiert.

## B.3 Proteinbiochemische Methoden

### B.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die durchgeführte SDS-PAGE orientiert sich an der Methode von LAEMMLI [160].

### B.3.2 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Proteinen in PAA-Gelen nach der PAGE erfolgte mit Coomassie [105, 329, 330].

### B.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde an einem Jasco UV/Vis-Spektrometer Scinco S-3100 bei 280 nm nach der Methode von WALTER und CHRISTIAN [331] oder nach dem LAMBERT-BEERSCHEN Gesetz unter Berücksichtigung des theoretischen Extinktionskoeffizienten [332] bestimmt.

### B.3.4 Expression und Reinigung der Trypsinvarianten

Die Trypsinvarianten wurden in DLM 101 $\alpha$ -Zellen überexprimiert. Hierfür wurde eine Vorkultur von 60 ml SC-Leur für drei Tagen bei 30 °C inkubiert. Diese wurde in 3 l YPD-Medium zur Überexpression überführt. Nach vier Tagen wurde der pH-Wert mit HCl auf vier eingestellt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 5750 g in einer Beckman Coulter Zentrifuge. Der Überstand wurde auf eine mit 2 mM Na-Acetat/ 100 mM Essigsäure (pH 4,5) equilibrierte Toyopearsäule M650 aufgetragen und mit 300 ml des Equilibrir-Puffers gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,2 M Tris-HCl bei pH 7,8. Alle trypsinhaltigen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE identifiziert und vereinigt. Es folgte ein Aufkonzentrierungsschritt mit Centriprep-10 Konzentratoren (AMICON). Hierbei wurde der Elutionspuffer gegen einen 20 mM MES-Puffer (pH 6) ausgetauscht. Die so erhaltene Lösung wurde mit Enterokinase für 4-7 Tage aktiviert. Nach abgeschlossener Aktivierung erfolgte eine Perfusionschromatographie (BioCAD<sup>®</sup> 700E) an einem starken Anionentauscher (POROS HQ20). Anschließend erfolgte eine Reinigung per Affinitätschromatographie.

### SBTI-Affinitätschromatographie

Die Chromatographie wurde in Anlehnung an die Methoden von PETERSON[333], REECK[334] und WU[335] als *batch*-Verfahren durchgeführt. Dabei wurde mit einem pH-Gradienten gegen 0,1 M Essigsäure und 10 mM CaCl<sub>2</sub> eluiert.

### Benzamidin-Affinitätschromatographie

Die Reinigung mit HiTrap<sup>™</sup> Benzamidin FF(HS) erfolgte als Niederdruckchromatographie an einer Äkta Prime Plus, wie von HIXSON[148] und VUENTO[147] beschrieben, mit einem pH-Gradienten gegen 50 mM Glycin pH 3.

### B.3.5 Bestimmung der Aktivität von Trypsin

Für die Aktivitätsassays wurde das UV/Vis-Spektrometer Jasco Scinco S-3100 verwendet. Als Substrat diente *N*- $\alpha$ -Benzoyl-*D*/*L*-arginyl-4-nitroanilid. Die Detektion erfolgte bei 390 nm, als Referenzwellenlänge dienten 510 nm. Als Puffersystem wurde 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl und 0,02 M CaCl<sub>2</sub> pH 7,4 verwendet. Alle Messreihen wurden bei 30 °C durchgeführt.

### **burst-phase-Titration**

Die *burst-phase*-Titrationen wurden unter den oben genannten Bedingungen, nach der Methode von CHASE[164] durchgeführt. Es wurden 5-10  $\mu\text{M}$  Enzym und 25-40  $\mu\text{M}$  Substrat eingesetzt. Die Messdauer betrug 10 min.

### **Titration mit TLCK**

Die Titration von Trypsin mit TLCK[175, 176] wurde unter den gleichen Bedingungen wie die *burst-phase*-Experimente durchgeführt. Die Messdauer der Kinetik wurde auf 40 min begrenzt.

## **B.3.6 Chromatographische und massenspektrometrische Analysen**

Die Analyse der Kinetiken der verwendeten Peptide und Ester sowie der untersuchten Proteine erfolgte chromatographisch an einem UPLC ACQUITY UPLC<sup>®</sup> System mit einer ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH 130 C18 1,7  $\mu\text{m}$  2,1 x 100 mm Säule. Die Laufmittel waren doppeltdestilliertes und entgastes Wasser sowie Acetonitril mit je 0,5 % Trifluoressigsäure. Der Fluss betrug 0,3-0,5 ml/min bei für die jeweilige Substanz optimierten Gradienten. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels MassLynx. Die entsprechenden Retentionszeiten sind im Anhang zu finden (C.1).

Alle Massenspektren wurden an einem MicroMass ZQ Massenspektrometer angefertigt. Hierzu wurden die entsprechende Proben per HPLC entsalzt. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte per MassLynx. Die Berechnung der Massen aus den Spektren für Moleküle größer 2000 Da erfolgt mit Hilfe des MaxEnt-Algorithmus (C.1).

## **B.3.7 Titration mit Ellman's-Reagenz**

Die Titration mit ELLMAN'S-Reagenz [187, 188] erfolgte in 0,1 M Tris-HCl, 4 mM EDTA pH 8,2 und 5 M Harnstoff. Hierzu wurden zunächst 5-10  $\mu\text{M}$  Enzym (Endkonzentration) in 10 M Harnstoff für 30 min denaturiert [139] und mit der entsprechenden Menge Mehrfachpuffer aufgefüllt, sowie mit 25  $\mu\text{M}$  DTNB versetzt und für 20 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des TNB-Gehalts mit einem UV/Vis-Spektrometer Jasco Scinco S-3100 bei 410 nm. Eine Eichgerade wurde zuvor mit Cystein erstellt.

## **B.3.8 CD-Spektren**

Die CD-Spektren wurden an einem Jasco J-810 CD-Spektrometer (siehe A.10) unter Verwendung einer 0,1 cm Quartzküvette bei 30 °C aufgenommen. Der verwendete Puffer war ein 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7,8. Die verwendete Enzymkonzentration entsprach 15  $\mu\text{M}$  [195]. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Spectra Analysis Software (siehe A.11).

### **Berechnung von Sekundärstrukturelementen**

Die Berechnung der Sekundärstrukturelemente erfolgt mit Hilfe von drei Algorithmen: 1. die Vorhersage der Sekundärstrukturelemente erfolgte mit dem Programm PSIPRED.

Dieses wurde verwendet, um aus den Aminosäuresequenzen die Sekundärstrukturelemente vorherzusagen [198, 199]. 2. wurde das Programm Jasco Secondary Structure Estimation verwendet, um mit Hilfe von Referenz-CD-Spektren Sekundärstrukturelemente aus den angefertigten CD-Spektren zu berechnen [200] und 3. wurde der Algorithmus K2D2 verwendet, um aus den CD-Spektren ohne Referenzspektren die Sekundärstrukturen zu berechnen [336].

### B.3.9 Bestimmung kinetischer Parameter

Alle Kinetiken, soweit nicht anders angegeben, wurden bei 30 °C und 900 rpm in einem Eppendorf Thermomixer comfort in 1,5 ml Polypropylengefäßen durchgeführt. Aus den entsprechenden Gefäßen wurden zu ausgewählten Zeitpunkten Aliquots entnommen und mit 1 Vol. 50%ige Essigsäure versetzt. Anschließend erfolgte eine chromatographische Untersuchung mittels UPLC (siehe A.10) bei 30 °C, einer Flussrate von 0,5 ml/min und bei 254 und 280 nm. Die Gradienten zur Trennung sind im Anhang aufgelistet (siehe C.1). Durch Integration der entsprechenden Peakflächen und die Bildung der Verhältnisse dieser konnten entsprechende Zeitumsatzkurven ermittelt werden. Für alle Substrate wurden Kinetiken ohne Enzym durchgeführt.

#### Typischer Reaktionsansatz

Für die nachfolgenden Bestimmungen der Umsatzgeschwindigkeiten setzte sich ein typischer Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

- 200 µl Ansatz:
  - 100 µl Puffer
  - x µl Acyldonor
  - y µl Acylakzeptor
  - z µl Trypsin
  - ad. 200 µl Wasser

Von diesem Ansatz wurden zu ausgewählten Zeitpunkten je 20 µl Ansatz entnommen und mit 1 Vol. 50%iger Essigsäure inaktiviert und anschließend analysiert.

#### Initiale Hydrolysegeschwindigkeiten

Die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten wurden wie oben beschrieben (siehe B.3.9) durchgeführt und orientierten sich an den Methoden von TANAKA [337] und LIEM [83]. Hierzu wurden 2 mM Substrat in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl und 0,01 M CaCl<sub>2</sub> vorgelegt und bei 30 °C für 10 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym in einem Konzentrationsbereich von 5 nM bis 100 µM gestartet. Bei der Aufnahme der Zeitverläufe wurde darauf geachtet, dass im linearen Bereich der Kinetik gemessen wurde. Die Bestimmung der Anstiege erfolgte mittels linearer Regression.

### Acyltransferexperimente

Bei den durchgeführten Acyltransferexperimenten fanden die gleichen Bedingungen wie bei der Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten Anwendung (4.3.2). Der Versuchsaufbau orientierte sich dabei an den  $S'_1$ -*Subsite-Mapping*-Versuchen von ULLMAN und JAKUBKE [191] bzw. von LOPES [338]. Es wurden 2 mM Acyldonor und 15 mM effektive Nucleophilkonzentration in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl und 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  vorgelegt und bei 30 °C für 10 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 nM-100  $\mu\text{M}$  Enzym gestartet. Das Zeitintervall entsprach der dreifachen Zeit vom Gesamtumsatz der Acyldonorkomponente.

### Bestimmung von $K_m$ und $k_{cat}$

Für die Bestimmung von  $K_m$  und  $k_{cat}$  wurden die Arbeit von MICHAELIS und MENTEN zugrunde gelegt [207]. Die Messungen erfolgten unter den gleichen Bedingungen, wie die Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten (siehe 4.3.2). Die Substratkonzentrationen variierten dabei, um zu einer entsprechenden v-S-Charakteristik zu gelangen. Die Auswertung und Bestimmung der einzelnen Parameter erfolgte mit dem Programm QtiPlot nach der Gleichung  $v = V_{Max} * [S]/(K_m + [S])$ .

Für den Wildtyp konnte aufgrund der hohen Umsatzgeschwindigkeiten und der hohen Affinität nicht auf die Bestimmung mit Hilfe einer v-S-Charakteristik zurückgegriffen werden. Alternativ wurde auf die um die LAMBERT-Funktion erweiterte integrierte MICHAELIS-MENTEN-Gleichung zurückgegriffen:  $[P] = [P_0] + [S_0] - K_m \omega \left\{ \left( \frac{[S_0]}{K_m} \right) * e^{\frac{[S_0] - V_{Max} t}{K_m}} \right\}$  [209]. Die für die LAMBERT-Funktion notwendigen Komponenten wurden dabei durch die muParser-Bibliothek innerhalb des Programms Qtiplot bereitgestellt.

### Bestimmung von $K_N$ , $k_N$ und Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnissen

Diese Bestimmungen erfolgten analog zu den Bestimmungen der  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte. Zugrunde gelegt wurde ein *Ping-Pong-bi-bi*-Mechanismus, so dass durch die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung die entsprechenden Parameter mit verschiedenen Acyldonor- und Acylakzeptor-Konzentrationen in v-S-Charakteristiken bestimmt werden konnten.

Die Determinierung der Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnisse erfolgte bei den maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der Deacylierung durch eine Aminokomponente als Nucleophil. Dabei wurden sowohl unter sättigenden Bedingungen als auch unter nicht sättigenden Bedingungen entsprechende Verhältnisse bestimmt.

Die Bestimmungen der Produkt- und Edukt-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf der Reaktion erfolgten mit Hilfe der UPLC.

### Sekundärhydrolyse

Zur Verifizierung der Sekundärhydrolyse wurden Acyltransferreaktion verwendet, wie sie unter Acyltransferexperimente beschrieben sind (vgl. B.3.9). Diese wurden in ihrem zeitlichen Verlauf und der erreichten Menge an Acyltransferprodukt aufeinander abgestimmt und die Hydrolyse des Acyltransferproduktes mit Hilfe der UPLC in ihrem zeitlichen Verlauf verfolgt. Aus diesen wurden durch lineare Regression die Raten der Sekundärhydrolyse bestimmt.

### Fehlerbestimmung

Für die Bestimmung einzelner Umsatzgeschwindigkeiten wurden entsprechende Substrat-Zeit-Kurven erstellt und der initiale Teil einer linearen Regression unterzogen. Es wurden je drei unabhängige Messreihen zu je 5-10 Messpunkten aufgenommen. Für die ermittelten Geschwindigkeiten wurden das arithmetische Mittel gebildet und die Spannweite bestimmt. Die so bestimmten Umsatzgeschwindigkeiten mit Spannweite wurden für die Bestimmung kinetischer Konstanten herangezogen. Hierfür wurden 7-12 Umsatzgeschwindigkeiten mit Spannweite bestimmt und in einer nicht linearen Anpassung mit Gewichtung entsprechend der angegebenen Gleichungen unterzogen. Aus den Parametern der Anpassung wurden die Konstanten und deren Abweichung bestimmt.

Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten der Hydrolyse-reaktion für den Wildtyp wurde die nicht lineare Kurvenanpassung direkt an den Daten der einzelnen Produkt-Zeit-Kurven angewendet. Hierzu wurden für drei Substratkonzentration je dreimal 10 Messpunkt generiert und die erhaltenen Kinetischen Konstanten gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

## B.3.10 Modifizierung von Parvulin 10

### Generierung von MA-Parvulin 10

Die Parvulin 10-Variante wurde von Frau Dr. Sandra Liebscher in einem pET26a-Vektor zur Verfügung gestellt. Die Expression erfolgte mit Hilfe der pelB-Sequenz in BL21-Zellen. Die Zellen wurden in LB-Medium bei einer OD von 0,6 mit 0,1 mM IPTG induziert und nach weiteren 4 h abzentrifugiert. Es erfolgte ein periplasmatischer Zellaufschluss durch osmotischen Schock nach den Methoden von NOSSAL [339] und RATHORE [340] und ein Zentrifugationsschritt bei 90000 g für 45 min bei 4 °C. Der Überstand wurde nach den Protokollen von RAHFELD weiter aufgearbeitet [233, 234].

Kontrollen erfolgten mit SDS-PAGE, Massenspektrometrie und HPLC.

### Modifizierung von MA-Parvulin 10

Die Modifizierung von MA-Parvulin 10 erfolgte nach den Protokollen von LIEBSCHER [78] mit den Acyldonoren 5/6-FAM-AAK-SMe und Abz-AAK-OME und wurde kinetisch mit Hilfe von HPLC und SDS-PAGE untersucht. Die Bestimmung der korrekten Modifizierung erfolgte durch Massenspektrometrie. Die Kontrolle der Funktionalität in Form von Aktivität des MA-Parvulin 10 und der modifizierten Varianten erfolgte nach Trennung von nicht modifizierter Spezies durch HPLC nach den Methoden von RAHFELD [233, 234] mit dem Substrat Suc-AAPF-pNA.

# C Anhang

## C.1 Liste Ester und Peptide

**Tabelle C.1** Liste Ester und Peptide - Die Retentionszeiten der Peptide und Ester wurden per UPLC oder HPLC analysiert. Die verwendeten Laufmittel waren A: 99,5 % Wasser, 0,5 % Trifluoressigsäure B: 99,5 % Acetonitril, 0,5 % Trifluoressigsäure. Getrennt wurde an einer ACQUITY UPLC® und BEH 130 C18 1,7 µm 2,1 x 100 mm Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min oder einer Waters Breeze HPLC mit VYDCA Protein & Peptide C18 Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min. Gradienten: a) 0-50 % in 6,5 min; b) 0-100 % in 6,5 min; c) 0-30 % in 6,5 min; d) 10-40 % in 15 min und e) 10-65 % in 40 min. Die Proben wurden zuvor mit Essigsäure angesäuert. Die Massen wurden mit einem Waters ZQ Micromass Massenspektrometer bestimmt. Die theoretischen Massen wurden mit Hilfe des Programms mMass berechnet.

Substanz	Retentionszeit (min)	Gradient	Masse berechnet	Masse gefunden
			m/z [M <sup>+</sup> +H]	
Bz-R-OEt	4,35	a	306,4	305,7
Bz-R-OH	3,95	a	278,3	278,1
Bz-RM-NH <sub>2</sub>	3,52	a	408,5	407,9
Bz-RE-NH <sub>2</sub>	2,02	a	406,4	406
Bz-RF-NH <sub>2</sub>	3,47	b	424,5	423,8
Bz-RR-NH <sub>2</sub>	2,47	a	433,5	432,1
Bz-RL-NH <sub>2</sub>	3,95	b	390,5	389,4
Bz-RA-NH <sub>2</sub>	3,1	a	348,4	347,2
Bz-RT-NH <sub>2</sub>	3,45	a	378,43	378,1
Bz-F-OMe	1,83	b	283,3	282,7
Bz-E-OMe	1,41	b	265,3	265,1
Bz-M-OMe	1,36	b	267,4	266,4
Bz-V-OMe	1,39	b	235,3	235,2
Bz-A-OMe	2,42	b	207,2	206,4
Bz-R-OMe	1,89	b	292,3	292,0
Z-K-OMe	2,26	b	294,4	292,9
Z-K-SMe	1,56	b	310,4	309
Bz-F-OH	1,39	b	269,3	268,4
Bz-E-OH	0,99	b	251,24	250,6
Bz-M-OH	1,03	b	253,3	252,4
Bz-V-OH	1,02	b	221,3	220,8
Bz-A-OH	2,06	b	193,2	194
Bz-R-OH	2,71	a	278,31	278,8
Z-K-OH	1,99	b	281,33	281,7
Boc-A-OCp	2,01	c	309,31	307,8
Boc-A-OH	2,55	c	189,2	188,4
Boc-A-OPh	2,91	c	265,3	265,5
Boc-A-OCap	2,06	c	308,3	307
Boc-A-OInd	3,62	c	348,4	347,8
Boc-A-OPic	2,08	c	280,32	280,4
Boc-A-SPOH	1,26	c	297,4	297,8

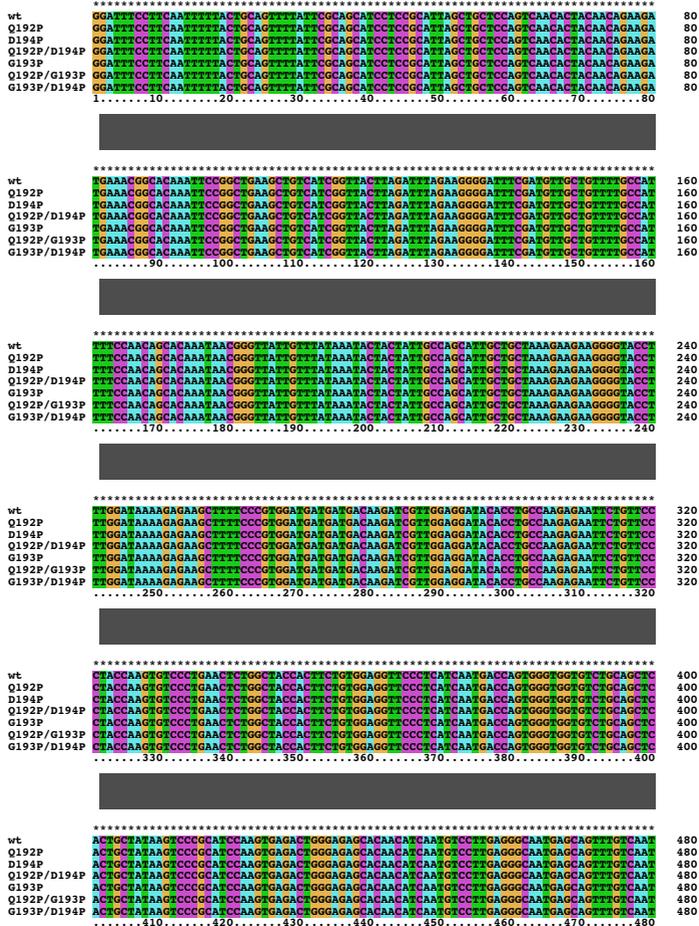
siehe nächste Seite

Substanz	Retentionszeit (min)	Gradient	Masse berechnet	Masse gefunden
			m/z [M <sup>+</sup> +H]	
Bz-AAYRHAAG	3,46	a	919,98	920,6
Bz-AAYR-OH	4,10	a	583,6	584
Bz-AAR	3,79	a	420,5	419,8
Bz-AARAAG	3,97	a	691,7	690,2
Z-K-NHMe	2,31	b	294,37	294,72
Bz-RFAAAG	4,88	a	695,8	696
Bz-G-OH	3,95	a	179,2	179,4
Bz-G-OGp	4,53	a	312,3	311,2
Bz-GM-NH <sub>2</sub>	2,59	c	310,4	309,5
Bz-GFAAAG	5,36	a	596,6	595,6
Bz-AARAG	4,98	c	549,6	549,8
Bz-AAR	3,79	c	421,47	421,38
Bz-K-OMe	3,08	a	264,32	264,4
Bz-K-OH	2,55	a	251,3	251,7
Bz-GMAAAG	4,82	c	580,7	580,6
Bz-RMAAAG	3,76	a	679,8	679,9
Bz-GAARAG	3,99	c	605,6	605,8
Bz-GAAR	3,77	c	477,5	476,6
Z-KMAAAG	1,67	a	682,7	683
Abz-AAK-OMe	3,10	d	408,5	409
Abz-AAK-OH	2,80	d	422,5	424
Abz-AAKMAAAG	6,70	d	810,0	809
Abz-AAKMAAKAG	5,80	d	938,1	939
Abz-AAKMAARAG	6,20	d	966,1	967
5/6-FAM-AAK-SMe	3,50	e	677,8	678
5/6-FAM-AAK-OH	3,00	e	647,6	548
Abz-AAKMAP <sub>Par10</sub>	35,8	e	10 693,4	10 699
5/6-FAM-AAKMAP <sub>Par10</sub>	35,6	e	10 932,6	10 931
				Ende

## C.2 Sequenzen

### C.2.1 Nukleotidsequenzen der Trypsinvarianten

Abbildung C.1 Nukleotidsequenzen der Trypsinvarianten wurden mit den Primern pYT-rev und Tryp-for im pYT-Vektor sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm clustalx verglichen.



```

*****
wt      GCTGCCAAGATCATCAAGCATCCCACCTCGAATAGGAAGACCCGAAACAATGACATCAGCTCGAAGAGCTCTCTTCCCC 560
Q192P  GCTGCCAAGATCATCAAGCATCCCACCTCGAATAGGAAGACCCGAAACAATGACATCAGCTCGAAGAGCTCTCTTCCCC 560
D194P  GCTGCCAAGATCATCAAGCATCCCACCTCGAATAGGAAGACCCGAAACAATGACATCAGCTCGAAGAGCTCTCTTCCCC 560
Q192P/D194P GCTGCCAAGATCATCAAGCATCCCACCTCGAATAGGAAGACCCGAAACAATGACATCAGCTCGAAGAGCTCTCTTCCCC 560
G193P  GCTGCCAAGATCATCAAGCATCCCACCTCGAATAGGAAGACCCGAAACAATGACATCAGCTCGAAGAGCTCTCTTCCCC 560
Q192P/G193P GCTGCCAAGATCATCAAGCATCCCACCTCGAATAGGAAGACCCGAAACAATGACATCAGCTCGAAGAGCTCTCTTCCCC 560
G193P/D194P GCTGCCAAGATCATCAAGCATCCCACCTCGAATAGGAAGACCCGAAACAATGACATCAGCTCGAAGAGCTCTCTTCCCC 560
.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560

```



```

*****
wt      TGTGAACCAAAAGCGCGAAGGGCCACTGGGCTTCCGAGCCCGCGACCGCGAAGCACTCAGGGCCCACTCCAG 640
Q192P  TGTGAACCAAAAGCGCGAAGGGCCACTGGGCTTCCGAGCCCGCGACCGCGAAGCACTCAGGGCCCACTCCAG 640
D194P  TGTGAACCAAAAGCGCGAAGGGCCACTGGGCTTCCGAGCCCGCGACCGCGAAGCACTCAGGGCCCACTCCAG 640
Q192P/D194P TGTGAACCAAAAGCGCGAAGGGCCACTGGGCTTCCGAGCCCGCGACCGCGAAGCACTCAGGGCCCACTCCAG 640
G193P  TGTGAACCAAAAGCGCGAAGGGCCACTGGGCTTCCGAGCCCGCGACCGCGAAGCACTCAGGGCCCACTCCAG 640
Q192P/G193P TGTGAACCAAAAGCGCGAAGGGCCACTGGGCTTCCGAGCCCGCGACCGCGAAGCACTCAGGGCCCACTCCAG 640
G193P/D194P TGTGAACCAAAAGCGCGAAGGGCCACTGGGCTTCCGAGCCCGCGACCGCGAAGCACTCAGGGCCCACTCCAG 640
.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640

```



```

*****
wt      GCTGGGGCAACAGCGCCAGCAGGGCCCAAGGAACAGACCCGCTCCAGCGCCGGAAGGCCCACTCCGCCCAAGCC 720
Q192P  GCTGGGGCAACAGCGCCAGCAGGGCCCAAGGAACAGACCCGCTCCAGCGCCGGAAGGCCCACTCCGCCCAAGCC 720
D194P  GCTGGGGCAACAGCGCCAGCAGGGCCCAAGGAACAGACCCGCTCCAGCGCCGGAAGGCCCACTCCGCCCAAGCC 720
Q192P/D194P GCTGGGGCAACAGCGCCAGCAGGGCCCAAGGAACAGACCCGCTCCAGCGCCGGAAGGCCCACTCCGCCCAAGCC 720
G193P  GCTGGGGCAACAGCGCCAGCAGGGCCCAAGGAACAGACCCGCTCCAGCGCCGGAAGGCCCACTCCGCCCAAGCC 720
Q192P/G193P GCTGGGGCAACAGCGCCAGCAGGGCCCAAGGAACAGACCCGCTCCAGCGCCGGAAGGCCCACTCCGCCCAAGCC 720
G193P/D194P GCTGGGGCAACAGCGCCAGCAGGGCCCAAGGAACAGACCCGCTCCAGCGCCGGAAGGCCCACTCCGCCCAAGCC 720
.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720

```



```

*****
wt      GACGTGAAGCCCTCCACCCGGAAAGATCACTGACAACATGGTCTGTGTGGCTTCCAGAGGGAGCCAAAGATTCCCG 800
Q192P  GACGTGAAGCCCTCCACCCGGAAAGATCACTGACAACATGGTCTGTGTGGCTTCCAGAGGGAGCCAAAGATTCCCG 800
D194P  GACGTGAAGCCCTCCACCCGGAAAGATCACTGACAACATGGTCTGTGTGGCTTCCAGAGGGAGCCAAAGATTCCCG 800
Q192P/D194P GACGTGAAGCCCTCCACCCGGAAAGATCACTGACAACATGGTCTGTGTGGCTTCCAGAGGGAGCCAAAGATTCCCG 800
G193P  GACGTGAAGCCCTCCACCCGGAAAGATCACTGACAACATGGTCTGTGTGGCTTCCAGAGGGAGCCAAAGATTCCCG 800
Q192P/G193P GACGTGAAGCCCTCCACCCGGAAAGATCACTGACAACATGGTCTGTGTGGCTTCCAGAGGGAGCCAAAGATTCCCG 800
G193P/D194P GACGTGAAGCCCTCCACCCGGAAAGATCACTGACAACATGGTCTGTGTGGCTTCCAGAGGGAGCCAAAGATTCCCG 800
.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800

```



```

* * * *****
wt      CCAGGGGACCTCGGGGCCCGGGCTCGAAAGGAGAGCCGAGGGCATGCTCCGGGGCAATGGCTGGCCCGCC 880
Q192P  CCAGGGGACCTCGGGGCCCGGGCTCGAAAGGAGAGCCGAGGGCATGCTCCGGGGCAATGGCTGGCCCGCC 880
D194P  CCAGGGGACCTCGGGGCCCGGGCTCGAAAGGAGAGCCGAGGGCATGCTCCGGGGCAATGGCTGGCCCGCC 880
Q192P/D194P CCAGGGGACCTCGGGGCCCGGGCTCGAAAGGAGAGCCGAGGGCATGCTCCGGGGCAATGGCTGGCCCGCC 880
G193P  CCAGGGGACCTCGGGGCCCGGGCTCGAAAGGAGAGCCGAGGGCATGCTCCGGGGCAATGGCTGGCCCGCC 880
Q192P/G193P CCAGGGGACCTCGGGGCCCGGGCTCGAAAGGAGAGCCGAGGGCATGCTCCGGGGCAATGGCTGGCCCGCC 880
G193P/D194P CCAGGGGACCTCGGGGCCCGGGCTCGAAAGGAGAGCCGAGGGCATGCTCCGGGGCAATGGCTGGCCCGCC 880
.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880

```



```

*****
wt      CAGATAACCCGGGTGACACCAAGGCTCGCAACTAAGGGACGGATCAGGACACAAATCCGCCCAACAGAGGCTCC 960
Q192P  CAGATAACCCGGGTGACACCAAGGCTCGCAACTAAGGGACGGATCAGGACACAAATCCGCCCAACAGAGGCTCC 960
D194P  CAGATAACCCGGGTGACACCAAGGCTCGCAACTAAGGGACGGATCAGGACACAAATCCGCCCAACAGAGGCTCC 960
Q192P/D194P CAGATAACCCGGGTGACACCAAGGCTCGCAACTAAGGGACGGATCAGGACACAAATCCGCCCAACAGAGGCTCC 960
G193P  CAGATAACCCGGGTGACACCAAGGCTCGCAACTAAGGGACGGATCAGGACACAAATCCGCCCAACAGAGGCTCC 960
Q192P/G193P CAGATAACCCGGGTGACACCAAGGCTCGCAACTAAGGGACGGATCAGGACACAAATCCGCCCAACAGAGGCTCC 960
G193P/D194P CAGATAACCCGGGTGACACCAAGGCTCGCAACTAAGGGACGGATCAGGACACAAATCCGCCCAACAGAGGCTCC 960
.....890.....900.....910.....920.....930.....940.....950.....960

```





```

*****
wt          TTTACACACTTTAAATAGCAATCACCTCAATACACATAAAAACAAAGCAATTTAAATTTGCCGCCGCCAATTT 1520
Q192P      TTTACACACTTTAAATAGCAATCACCTCAATACACATAAAAACAAAGCAATTTAAATTTGCCGCCGCCAATTT 1520
D194P      TTTACACACTTTAAATAGCAATCACCTCAATACACATAAAAACAAAGCAATTTAAATTTGCCGCCGCCAATTT 1520
Q192P/D194P TTTACACACTTTAAATAGCAATCACCTCAATACACATAAAAACAAAGCAATTTAAATTTGCCGCCGCCAATTT 1520
G193P      TTTACACACTTTAAATAGCAATCACCTCAATACACATAAAAACAAAGCAATTTAAATTTGCCGCCGCCAATTT 1520
Q192P/G193P TTTACACACTTTAAATAGCAATCACCTCAATACACATAAAAACAAAGCAATTTAAATTTGCCGCCGCCAATTT 1520
G193P/D194P TTTACACACTTTAAATAGCAATCACCTCAATACACATAAAAACAAAGCAATTTAAATTTGCCGCCGCCAATTT 1520
.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500.....1510.....1520

```

```

*****
wt          CAATTTGTAATAAAATCCATAAATTAACCAATTAGTAGAGCAAAAAAGATGAATCGAAACGAACCCAAAGAAATTTGG 1600
Q192P      CAATTTGTAATAAAATCCATAAATTAACCAATTAGTAGAGCAAAAAAGATGAATCGAAACGAACCCAAAGAAATTTGG 1600
D194P      CAATTTGTAATAAAATCCATAAATTAACCAATTAGTAGAGCAAAAAAGATGAATCGAAACGAACCCAAAGAAATTTGG 1600
Q192P/D194P CAATTTGTAATAAAATCCATAAATTAACCAATTAGTAGAGCAAAAAAGATGAATCGAAACGAACCCAAAGAAATTTGG 1600
G193P      CAATTTGTAATAAAATCCATAAATTAACCAATTAGTAGAGCAAAAAAGATGAATCGAAACGAACCCAAAGAAATTTGG 1600
Q192P/G193P CAATTTGTAATAAAATCCATAAATTAACCAATTAGTAGAGCAAAAAAGATGAATCGAAACGAACCCAAAGAAATTTGG 1600
G193P/D194P CAATTTGTAATAAAATCCATAAATTAACCAATTAGTAGAGCAAAAAAGATGAATCGAAACGAACCCAAAGAAATTTGG 1600
.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600

```

```

*****
wt          AHCIGATCCACAGGACGGGRRGGCCCCAGATGCCCGATCCGATAGCGGTCACAGACCCGAAGCCGAAGCCAGCAG 1673
Q192P      AHCIGATCCACAGGACGGGRRGGCCCCAGATGCCCGATCCGATAGCGGTCACAGACCCGAAGCCGAAGCCAGCAG 1673
D194P      AHCIGATCCACAGGACGGGRRGGCCCCAGATGCCCGATCCGATAGCGGTCACAGACCCGAAGCCGAAGCCAGCAG 1673
Q192P/D194P AHCIGATCCACAGGACGGGRRGGCCCCAGATGCCCGATCCGATAGCGGTCACAGACCCGAAGCCGAAGCCAGCAG 1673
G193P      AHCIGATCCACAGGACGGGRRGGCCCCAGATGCCCGATCCGATAGCGGTCACAGACCCGAAGCCGAAGCCAGCAG 1673
Q192P/G193P AHCIGATCCACAGGACGGGRRGGCCCCAGATGCCCGATCCGATAGCGGTCACAGACCCGAAGCCGAAGCCAGCAG 1673
G193P/D194P AHCIGATCCACAGGACGGGRRGGCCCCAGATGCCCGATCCGATAGCGGTCACAGACCCGAAGCCGAAGCCAGCAG 1673
.....1610.....1620.....1630.....1640.....1650.....1660.....1670...

```

### C.2.2 Aminosäuresequenzen der Trypsinvarianten

Abbildung C.2 Die Aminosäuresequenzen der Trypsinvarianten wurden aus den Nukleotidsequenzen abgeleitet und mit dem Programm clustalx verglichen.

```

*****
wt-Trypsin  IVGGYTCQENSVPYQVLSNSGYHPCGGSLINDQWVWSAACHYKRSRIQVRLGHHINVLGNEGFVNAAKIIKHPNFRDKI  80
Q192P      IVGGYTCQENSVPYQVLSNSGYHPCGGSLINDQWVWSAACHYKRSRIQVRLGHHINVLGNEGFVNAAKIIKHPNFRDKI  80
G193P      IVGGYTCQENSVPYQVLSNSGYHPCGGSLINDQWVWSAACHYKRSRIQVRLGHHINVLGNEGFVNAAKIIKHPNFRDKI  80
D194P      IVGGYTCQENSVPYQVLSNSGYHPCGGSLINDQWVWSAACHYKRSRIQVRLGHHINVLGNEGFVNAAKIIKHPNFRDKI  80
Q192P/G193P IVGGYTCQENSVPYQVLSNSGYHPCGGSLINDQWVWSAACHYKRSRIQVRLGHHINVLGNEGFVNAAKIIKHPNFRDKI  80
G193P/D194P IVGGYTCQENSVPYQVLSNSGYHPCGGSLINDQWVWSAACHYKRSRIQVRLGHHINVLGNEGFVNAAKIIKHPNFRDKI  80
Q192P/D194P IVGGYTCQENSVPYQVLSNSGYHPCGGSLINDQWVWSAACHYKRSRIQVRLGHHINVLGNEGFVNAAKIIKHPNFRDKI  80
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80

```

```

*****
wt-Trypsin  LNNIDLMIKLSPPVKLNARVAIVALPSSCAPAGTQCLISGWGNTLSSGVNEDLLCLDAPLLPQADCEASYPGKITDNN  160
Q192P      LNNIDLMIKLSPPVKLNARVAIVALPSSCAPAGTQCLISGWGNTLSSGVNEDLLCLDAPLLPQADCEASYPGKITDNN  160
G193P      LNNIDLMIKLSPPVKLNARVAIVALPSSCAPAGTQCLISGWGNTLSSGVNEDLLCLDAPLLPQADCEASYPGKITDNN  160
D194P      LNNIDLMIKLSPPVKLNARVAIVALPSSCAPAGTQCLISGWGNTLSSGVNEDLLCLDAPLLPQADCEASYPGKITDNN  160
Q192P/G193P LNNIDLMIKLSPPVKLNARVAIVALPSSCAPAGTQCLISGWGNTLSSGVNEDLLCLDAPLLPQADCEASYPGKITDNN  160
G193P/D194P LNNIDLMIKLSPPVKLNARVAIVALPSSCAPAGTQCLISGWGNTLSSGVNEDLLCLDAPLLPQADCEASYPGKITDNN  160
Q192P/D194P LNNIDLMIKLSPPVKLNARVAIVALPSSCAPAGTQCLISGWGNTLSSGVNEDLLCLDAPLLPQADCEASYPGKITDNN  160
.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160

```

```

*****
wt-Trypsin  VCVGFLEGGKSDCPDSSGGPVVCCGELQIVSWGVCALPDNPGVYTKVCNVVDMQDITAA  223
Q192P      VCVGFLEGGKSDCPDSSGGPVVCCGELQIVSWGVCALPDNPGVYTKVCNVVDMQDITAA  223
G193P      VCVGFLEGGKSDCPDSSGGPVVCCGELQIVSWGVCALPDNPGVYTKVCNVVDMQDITAA  223
D194P      VCVGFLEGGKSDCPDSSGGPVVCCGELQIVSWGVCALPDNPGVYTKVCNVVDMQDITAA  223
Q192P/G193P VCVGFLEGGKSDCPDSSGGPVVCCGELQIVSWGVCALPDNPGVYTKVCNVVDMQDITAA  223
G193P/D194P VCVGFLEGGKSDCPDSSGGPVVCCGELQIVSWGVCALPDNPGVYTKVCNVVDMQDITAA  223
Q192P/D194P VCVGFLEGGKSDCPDSSGGPVVCCGELQIVSWGVCALPDNPGVYTKVCNVVDMQDITAA  223
.....170.....180.....190.....200.....210.....220...

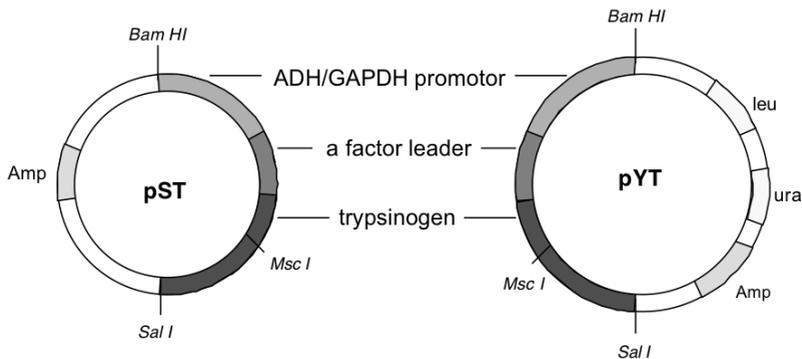
```

### C.2.3 Aminosäuresequenzen von Parvulin10 und Varianten

**Abbildung C.3** Aminosäuresequenzen von Parvulin 10 und den erhaltenen und verwendeten Sequenzen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm clustalx verglichen.



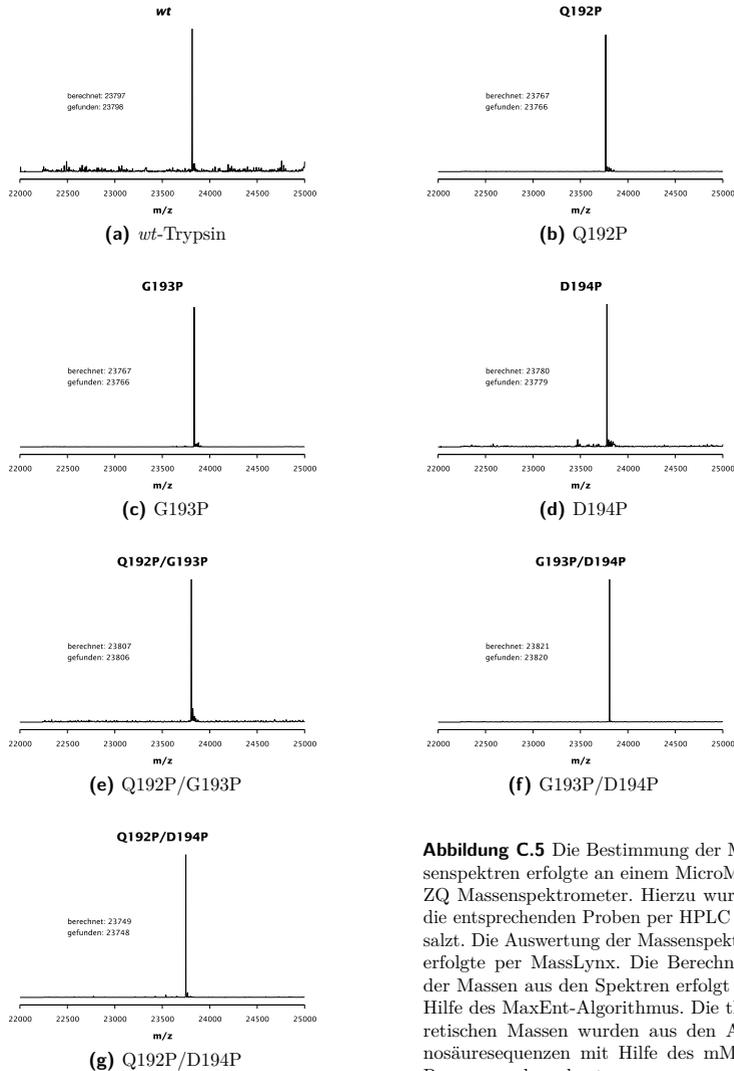
### C.2.4 Vektoren



**Abbildung C.4** Die verwendeten Vektoren pST und pYT mit der Ampicillin-Resistenz (Amp), den Selektionsmarkern für Uracil-(ura) und Leucin-(leu)-Defizienz, den Schnittstellen *Bam*HI, *Sal*I und *Msc*I, dem ADH/GAPDH-Promotor, dem  $\alpha$ -Faktor-Leader, sowie dem Trypsinogen-Konstrukt. Entnommen aus [79].

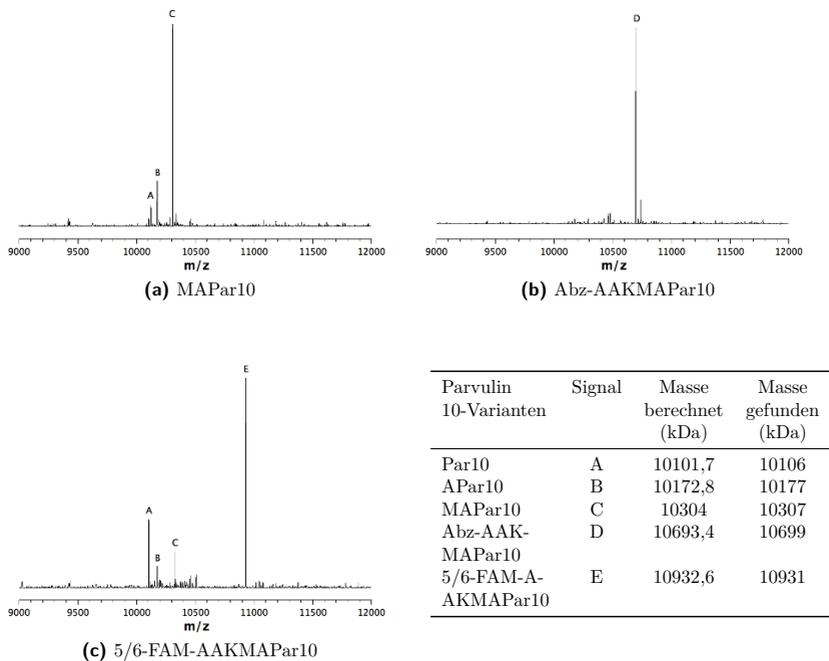
## C.3 Massenspektren und Chromatogramme

### C.3.1 Massenspektren der generierten Trypsinvarianten



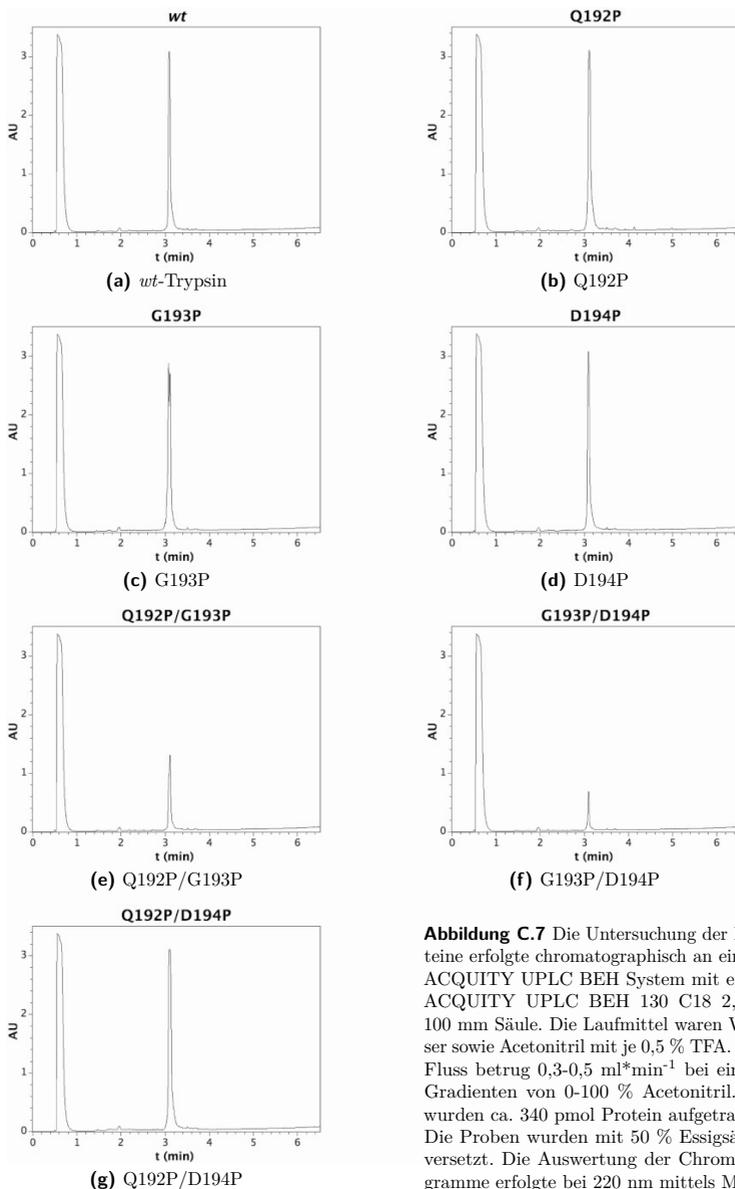
**Abbildung C.5** Die Bestimmung der Massenspektren erfolgte an einem MicroMass ZQ Massenspektrometer. Hierzu wurden die entsprechenden Proben per HPLC entsalzt. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte per MassLynx. Die Berechnung der Massen aus den Spektren erfolgt mit Hilfe des MaxEnt-Algorithmus. Die theoretischen Massen wurden aus den Aminosäuresequenzen mit Hilfe des mMass-Programms berechnet.

## C.3.2 Massenspektren vom Parvulin 10 und dessen Varianten



**Abbildung C.6** Massenspektrometrische Untersuchungen der modifizierten Parvulin 10-Varianten. Die Parvuline Abz-AAKMAPar10 und 5/6-FAM-AAKMAPar10 wurden erzeugt aus MA-Parvulin 10 (480  $\mu\text{M}$ ) durch Inkubation für 3 h mit 20 mM Acyl donor (Abz-AAK-Ome oder 5/6-FAM-AAK-SMe) mit 0,5  $\mu\text{M}$  Q192P in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM DTT, pH 8 und 30 °C. Die Trennung vom Reaktionsgemisch erfolgte im semipräparativen Maßstab durch HPLC.

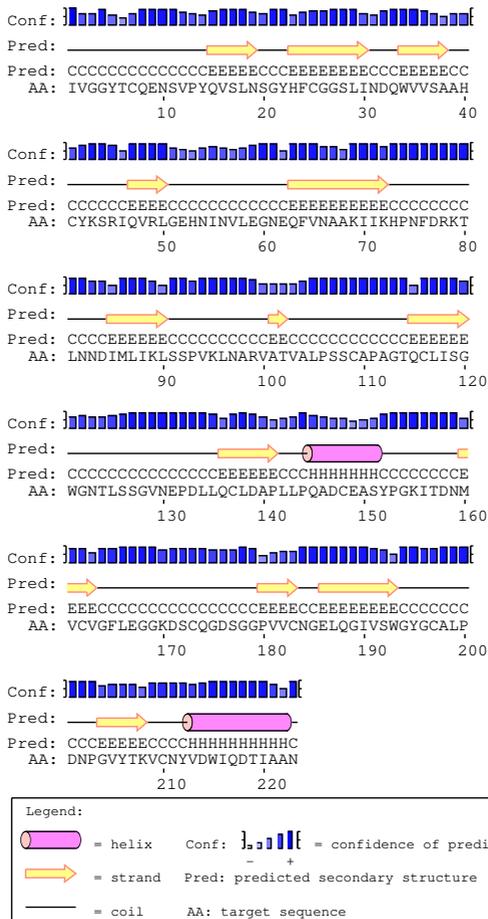
### C.3.3 Chromatogramme der generierten Trypsinvarianten



**Abbildung C.7** Die Untersuchung der Proteine erfolgte chromatographisch an einem ACQUITY UPLC BEH System mit einer ACQUITY UPLC BEH 130 C18 2,1 × 100 mm Säule. Die Laufmittel waren Wasser sowie Acetonitril mit je 0,5 % TFA. Der Fluss betrug  $0,3-0,5 \text{ ml}^* \text{min}^{-1}$  bei einem Gradienten von 0-100 % Acetonitril. Es wurden ca. 340 pmol Protein aufgetragen. Die Proben wurden mit 50 % Essigsäure versetzt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte bei 220 nm mittels MassLynx.

## C.4 Sekundärstruktur der Trypsinvarianten

**Abbildung C.8** Ergebnisse der Sekundärstrukturberechnung aus der Aminosäuresequenz mit dem Programm PSIPRED. Die Berechnungen der Sekundärstrukturelemente für alle in dieser Arbeit beschriebenen Trypsinvarianten entsprechen diesem Ergebnis.



## C.5 Effizienzparameter der Trypsinvarianten

### C.5.1 Effizienzparameter beim Acyltransfer auf Aminosäureamide

**Tabelle C.3** Acyltransfer-Aminosäureamide - Zusammenfassung der Einzelparameter der Acyltransferreaktion von Bz-R-OEt auf Aminosäureamide katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten. Bestimmt wurden die maximale Ausbeute, die Hydrolysegeschwindigkeit des Esters ( $v_{\text{(Ester-Hydrolyse)}}$ ), die Aminolysegeschwindigkeit ( $v_{\text{(Ester-Aminolyse)}}$ ) und die Geschwindigkeit der Produkthydrolyse ( $v_{\text{(Produkthydrolyse)}}$ ). Aus diesen Parametern wurde die Effizienz berechnet nach:  $E = \frac{v_{\text{Aminolyse}} * \text{Maximale Ausbeute}(\%) }{v_{\text{Produkthydrolyse}} * 100\%}$ . Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8; 30 °C; 2 mM Ester; 15 mM effektive Nukleophilkonzentration; Enzymkonzentration: [wt] 1,5 nM; [Q192P] 5,2 nM; [G193P] 0,52 μM; [D194P] 0,49 μM; [Q192P/G193P] 0,77 μM; [Q193P/D194P] 78 μM; [Q192P/D194P] 6,2 μM.

Enzym	Maximale Ausbeute (%)	v			Effizienz	Nukleophil
		Hydrolyse (μmol*h <sup>-1</sup> )	Aminolyse (μmol*h <sup>-1</sup> )	Produkthydrolyse (μmol*h <sup>-1</sup> )		
<i>wt</i>	44,4	220	185	123	0,67	M-NH <sub>2</sub>
	25,25	473	171	15,5	2,8	F-NH <sub>2</sub>
	26,05	332	119	14	2,21	L-NH <sub>2</sub>
	11,35	538	69	5,5	1,42	R-NH <sub>2</sub>
	1,3	959	13	0,8	0,21	E-NH <sub>2</sub>
	0	429	0,01	0,1	0	A-NH <sub>2</sub>
	5,58	402	28	2,2	0,71	T-NH <sub>2</sub>
Q192P	32,03	553	261	1,88	44,5	M-NH <sub>2</sub>
	12,9	600	90	3	3,87	F-NH <sub>2</sub>
	13,3	1613	250	1,1	30,22	L-NH <sub>2</sub>
	4,15	131	8,1	0,11	3,06	R-NH <sub>2</sub>
	2,7	1613	20	0,5	1,08	E-NH <sub>2</sub>
	0	1904	0,0	0,1	0	A-NH <sub>2</sub>
	2,5	1949	50	0,34	3,7	T-NH <sub>2</sub>
G193P	0,3	398	0,1	0,1	0,003	M-NH <sub>2</sub>
	0	378	0	0,1	0	F-NH <sub>2</sub>
	0	398	0	0,1	0	L-NH <sub>2</sub>
	0,2	402	0,017	0,1	0,000 34	R-NH <sub>2</sub>
	0	350	0	0,1	0	E-NH <sub>2</sub>
	0	599	0	0,1	0	A-NH <sub>2</sub>
	0	578	0	0,1	0	T-NH <sub>2</sub>
D194P	23,95	277	76	0,1	182	M-NH <sub>2</sub>
	26,6	234	81	1,9	11,34	F-NH <sub>2</sub>
	5,95	275	16	0,1	9,52	L-NH <sub>2</sub>
	2,2	250	4,8	0,1	1,056	R-NH <sub>2</sub>
	1,65	292	3,9	0,1	0,64	E-NH <sub>2</sub>
	0	268	0	0,1	0	A-NH <sub>2</sub>
	3,1	355	10	0,1	3,1	T-NH <sub>2</sub>
Q192P/ G193P	0,8	652	5,4	0,1	0,43	M-NH <sub>2</sub>
	0,5	534	3	0,1	0,15	F-NH <sub>2</sub>
	0,14	672	0,8	0,1	1,12	L-NH <sub>2</sub>
	0	603	0	0,1	0	R-NH <sub>2</sub>
	0	571	0	0,1	0	E-NH <sub>2</sub>
	3,8	482	76	19	0,152	A-NH <sub>2</sub>
	0	499	0,01	0,01	0	T-NH <sub>2</sub>
G193P/ D194P	29	420	178	1,3	39	M-NH <sub>2</sub>
	37,2	334	237	0,1	881	F-NH <sub>2</sub>
	12,25	494	38	0,12	38	L-NH <sub>2</sub>

siehe nächste Seite

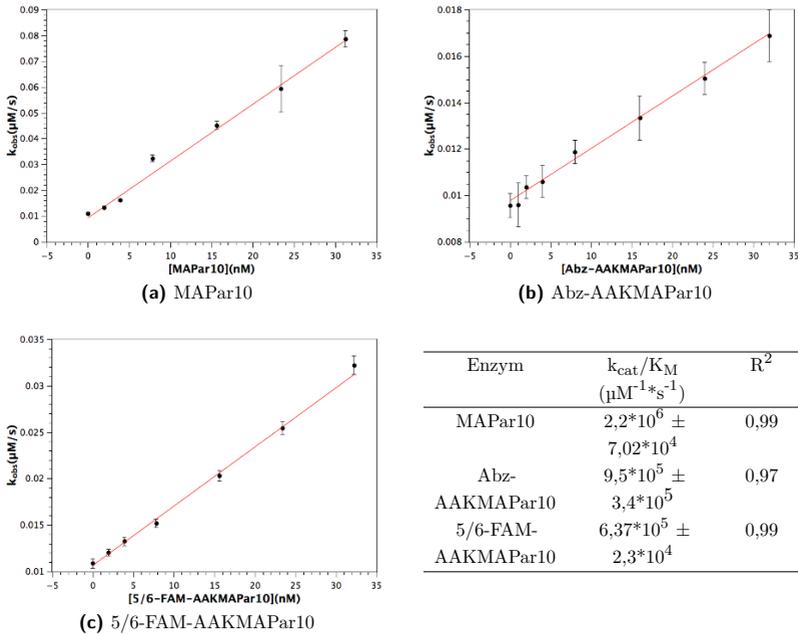
Enzym	Maximale Ausbeute (%)	v			Effizienz	Nukleophil
		Hydrolyse ( $\mu\text{mol}^*\text{h}^{-1}$ )	Aminolyse ( $\mu\text{mol}^*\text{h}^{-1}$ )	Produkthydrolyse ( $\mu\text{mol}^*\text{h}^{-1}$ )		
	1,45	453	6,1	0,08	1,1	R-NH <sub>2</sub>
	3,05	493	20	0,25	2,44	E-NH <sub>2</sub>
	0	554	0	0,1	0	A-NH <sub>2</sub>
	2,95	637	19	0,1	5,6	T-NH <sub>2</sub>
Q192P/	27,7	390	150	0,1	415,5	M-NH <sub>2</sub>
D194P	33,3	160	81	0,1	269,7	F-NH <sub>2</sub>
	4,6	525	25	0,1	11,5	L-NH <sub>2</sub>
	0	479	0	0,01	0	R-NH <sub>2</sub>
	0	518	0	0,01	0	E-NH <sub>2</sub>
	0	472	0	0,01	0	A-NH <sub>2</sub>
	0	485	0	0,01	0	T-NH <sub>2</sub>
						Ende

## C.5.2 Effizienzparameter beim Acyltransfer auf Pentapeptide

**Tabelle C.4** Acyltransfer-Pentapeptide - Zusammenfassung der Einzelparameter der Acyltransferreaktionen von verschiedenen Estern auf Pentapeptide katalysiert durch *wt*-Trypsin und die Trypsinvarianten. Bestimmt wurden die maximale Ausbeute, die Hydrolysegeschwindigkeit des Esters ( $v_{\text{Ester-Hydrolyse}}$ ), die Aminolysegeschwindigkeit ( $v_{\text{Ester-Aminolyse}}$ ) und die Geschwindigkeit der Produkthydrolyse ( $v_{\text{Produkthydrolyse}}$ ). Aus diesen Parameter wurde die Effizienz berechnet nach:  $E = \frac{v_{\text{Aminolyse}} * \text{Maximale Ausbeute}(\%)}{v_{\text{Produkthydrolyse}} * 100\%}$ . Bedingungen: 100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 8; 30 °C; 2 mM Ester; 15 mM effektive Nukleophilkonzentration; Enzymkonzentration: [wt] 1,5 nM; [Q192P] 5,2 nM; [D194P] 0,49  $\mu\text{M}$ ; [Q193P/D194P] 78  $\mu\text{M}$ ; [Q192P/D194P] 6,2  $\mu\text{M}$ .

Enzym	Maximale Ausbeute	$v_{\text{Hydrolyse}}$	$v_{\text{Aminolyse}}$	$v_{\text{Produkthydrolyse}}$	Effizienz	Ester	Nukleophil
	(%)	( $\mu\text{mol} * \text{h}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol} * \text{h}^{-1}$ )	( $\mu\text{mol} * \text{h}^{-1}$ )			
<i>wt</i>	61	292	444	61	4,39	Bz-R-OEt	MAAAG
	30,6	443	306	6,4	14,5	Bz-R-OEt	FAAAG
	37	64	81	1,4	21	Bz-G-OGp	MAAAG
	30,6	46	48	5,5	9,6	Bz-G-OGp	FAAAG
	15	23	62	1,0	0,09	Bz-G-OGp	AARAG
	55	524	650	54	6,6	Z-K-SMe	MAAAG
Q192P	1,3	959	13	0,8	0,21	Bz-R-OEt	MAAAG
	0	429	0,01	0,01	0	Bz-R-OEt	FAAAG
	5,58	402	28	2,2	0,71	Bz-G-OGp	MAAAG
	37	46	60	0,1	222	Bz-G-OGp	FAAAG
	31	0	0,77	0,37	0,67	Bz-G-OGp	AARAG
	58	404	563	0,46	709	Z-K-SMe	MAAAG
D194P	56	213	239	0,1	1339	Bz-R-OEt	MAAAG
	10	105	7,5	0,1	7,5	Bz-R-OEt	FAAAG
	37	59	131	0,1	484	Bz-G-OGp	MAAAG
	34	54	47	0,1	159	Bz-G-OGp	FAAAG
	32	0,1	1,35	0,38	1,13	Bz-G-OGp	AARAG
	62	513	682	0,22	1922	Z-K-SMe	MAAAG
G193P/ D194P	22	411	141	7,2	0,22	Bz-R-OEt	MAAAG
	0	562	0,1	0,1	0	Bz-R-OEt	FAAAG
	10	57	62	7,2	0,1	Bz-G-OGp	MAAAG
	0	152	0,1	0,1	0	Bz-G-OGp	FAAAG
	0	0,8	0,1	0,1	0	Bz-G-OGp	AARAG
			n.B.			Z-K-SMe	MAAAG
Q192P/ D194P	0	448	0,1	0,1	0	Bz-R-OEt	MAAAG
	0	438	0,1	0,1	0	Bz-R-OEt	FAAAG
	0	117	0,1	0,1	0	Bz-G-OGp	MAAAG
	0	105	0,1	0,1	0	Bz-G-OGp	FAAAG
				n.B.			Bz-G-OGp
			n.B.			Z-K-SMe	MAAAG

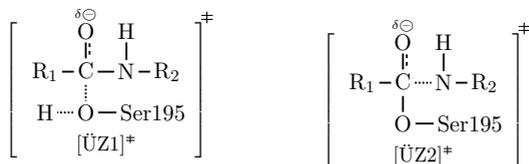
## C.6 $k_{cat}/K_m$ -Bestimmung der modifizierten Parvulin 10-Varianten



**Abbildung C.9** Untersuchung der Aktivität der modifizierten Parvulin 10-Varianten. Die Parvuline Abz-AAKMAPar10 und 5/6-FAM-AAKMAPar10 wurden erzeugt aus MA-Parvulin 10 (480  $\mu\text{M}$ ) durch Inkubation für 3 h mit 20 mM Acyl donor (Abz-AAK-OME oder 5/6-FAM-AAK-SME) mit 0,5  $\mu\text{M}$  Q192P in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM DTT, pH 8 und 30 °C. Die Trennung vom Reaktionsgemisch erfolgte im semipräparativen Maßstab durch HPLC. Die Aktivität wurde mit Hilfe des Protease-gekoppelten PPIase-Assays nach FISCHER [232] bestimmt. Verwendet wurde das Substrat Suc-AAPF-pNA (25  $\mu\text{M}$ ) in 35 mM HEPES, pH 8 mit 8  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Chymotrypsin. Detektiert wurde bei 390 nm, als Referenz wurde die Wellenlänge 590 nm verwendet.

## C.7 Schemata der Übergangszustände von Trypsin katalysierten Reaktionen

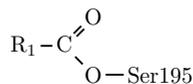
Übergangszustände Acylierung



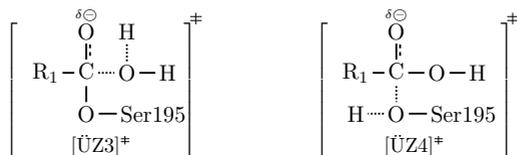
Tetrahedrale Intermediate



Acylenzym



Übergangszustände Deacylierung



**Abbildung C.10** Schematische Darstellung der Übergangszustände und Intermediate von Trypsin katalysierten Reaktionen (Ergänzung zu 4.8).

## Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren

**Table C.5** Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren

Alanin	(Ala)	A	Methionin	(Met)	M
Cystein	(Cys)	C	Asparagin	(Asn)	N
Asparaginsäure	(Asp)	D	Prolin	(Pro)	P
Glutaminsäure	(Glu)	E	Glutamin	(Gln)	Q
Phenylalanin	(Phe)	F	Arginin	(Arg)	R
Glycin	(Gly)	G	Serin	(Ser)	S
Histidin	(His)	H	Threonin	(Thr)	T
Isoleucin	(Ile)	I	Valin	(Val)	V
Lysin	(Lys)	K	Tryptophan	(Trp)	W
Leucin	(Leu)	L	Tyrosin	(Tyr)	Y

# Index

4'-Phosphopantethein, 13  
6-Carboxyfluorescein-Succinimidester, 131

## A

Acylakzeptor, 37  
Acylenzym, 51, 78  
-intermediat, 7, 14, 17, 28, 35-37, 40, 51, 70, 71, 73, 86  
Acylierung, 73  
Acyrest, 80  
Acyltransferexperimente, 135  
Acyltransferreaktion, 37, 38  
Affinität, 48, 84  
Affinitätschromatographie, 24, 48, 132  
Aggregation, 41, 87  
Aktivierungsenergie, 16  
Aktivität  
  Assay, 132  
  Test, 26, 53  
Alkoholat, 74  
Amidase-Aktivität, 80  
Aminoacyladenylat, 13  
Aminoacyl-tRNA, 3  
  Synthetase, 3, 5  
Aminobenzoessäure, 131  
Aminolyse- zu Hydrolyse-Verhältnis, 84, 87  
anionisches Rattentrypsin II, 16, 18, 19, 28, 30, 58  
Aspartamsynthese, 7  
Autolyse, 24  
  Reaktion, 60

## B

Bacillibactin, 13  
Benzamidin, 24, 46, 48, 49  
Blutgerinnungsfaktor XIa, 49  
BRAUNSCHWEIG ENZYME DATABASE , 3  
*burst-phase*-Titration, 27, 28, 49-51, 64, 133

## C

Carbonsäurederivate, 63  
CD, 54  
  Spektren, 54, 133  
  Spektroskopie, 31  
*Charge-Relay*-System, 29, 58  
chemische Synthesen, 129  
Chromophor, 42  
Chymotrypsin, 15

Circulardichroismus, 54  
Clostripain, 31, 52  
*C-N*-Ligasen, 6  
Coomassie, 132  
*C*-terminale Modifizierung, 11  
Cyclosporin, 13  
Cysteinpeptidase, 12

## D

Deacylierung, 7, 8, 73, 85  
Dimerbildung, 53  
Disulfidverbrückung, 30, 52, 57  
DNA-Sequenzierung, 26

## E

Effizienz, 37  
  Parameter, 80, 81  
Effizienzparameter, 37, 38  
Elektronendichte, 79  
ELLMAN  
  Reagenz, 30, 133  
  Test, 30, 31, 52, 53  
Energieberechnung, 69  
Energiedifferenz, 69, 71  
Enterokinase, 24, 45  
Enthalpie, 34-36  
Enzymdesign, 10  
enzymkatalysierte Peptidligation, 14  
enzymkatalysierte Peptidsynthese, 11, 13  
Erweiterung des genetischen Codes, 3  
Esterase-Aktivität, 80  
*Expressed-Protein-Ligation*, 4, 5  
Expression, 132

## F

Festphasenpeptidsynthese, 4  
Fließbandmechanismus, 13  
Fmoc-Synthese, 130  
FOURIER-Transformations-Infrarotspektroskopie, 77  
freie Thiole, 52  
Freiheitsgrad, 86  
*fusion-tags*, 42

## G

geschwindigkeitsbestimmender Schritt, 79  
Gleichgewichtskonstante, 35  
Glycin 193 als Scharnier, 58

- Gramicidin S, 13  
grampositiver Bakterien, 12  
GSH-GSSG-System, 24
- H**  
*head-to-tail*-Kondensation, 14  
Hefezellen, 23  
HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung, 40  
Hydrolysegeschwindigkeit, 61, 62, 134  
Hydrolyseprodukt, 7  
Hydrolysestudien, 59
- I**  
Iminostruktur, 18  
*induced fit*-Modell, 76  
Inhibitor, 26, 27, 49  
initiale Hydrolysegeschwindigkeit, 33, 59  
intermolekularen Disulfide, 53
- J**  
Jasco Secondary Structure Estimation, 32
- K**  
K2D2, 32  
 $k_{cat}$ -Wert, 72, 73, 75, 76, 79, 135  
 $K_m$ -Wert, 72, 73, 76, 79, 135  
Kaskade von Wasserstoffbrücken, 76  
Katalysegeschwindigkeit, 86  
katalytische Triade, 14, 17, 18, 50, 59  
kinetisch kontrollierte Proteasen, 15, 26  
kinetisch kontrollierte Proteolyse, 6, 7  
kinetische Parameter, 83  
konzertierte Reaktion, 17  
konzertierter Mechanismus, 78
- L**  
LAMBERT-BEERSCHE-Gesetz, 28, 31  
LAMBERT-Funktion, 135  
Ligationsverfahren, 4  
Lipase B, 80  
Lösungsmitteloptimierung, 8  
*low barrier hydrogen bond*, 17  
LPXTG-Motiv, 12
- M**  
Makrozyklisierung, 13  
*Ping-Pong-bi-bi*-Mechanismus, 40  
mechanistische Inhibitoren, 27  
menschliches Trypsin 4, 49  
MERRIFIELD, 4, 5  
Methode der gemischten Anhydride, 129  
Methylchymotrypsin, 15  
MICHAELIS-MENTEN-Gleichung, 34, 40, 135  
MICHAELIS-MENTEN-Kinetik, 67  
MICHAELIS-MENTEN-Komplex, 17, 35, 51, 73, 78, 79  
Mischanhydrid, 129
- Modifizierungen, 11  
Multienzymkomplex, 13  
Murein-Sacculus, 12
- N**  
natürlich chemische Ligation, 4  
nichtribosomale Peptidsynthetase, 11, 13, 19  
NMR, 31  
N-terminale Modifikation, 11  
N-terminale Modifizierung, 41, 42, 45, 89, 96  
Nukleophil, 37
- O**  
Oxyanion, 17, 18  
Oxyanion-Loch, 16–19, 23, 24, 27, 28, 34, 36, 45, 48, 49, 53, 58, 61, 64, 73, 75, 76, 86, 95
- P**  
Partitionskonstante, 39  
Partitionswert, 37, 38  
Parvulin, 11  
Parvulin 10, 42, 90, 91, 136  
Peptidantibiotika, 13  
Peptidrückrat, 12  
Peptidsynthese  
    automatisierte, 4  
*Peptidyl Carrier Protein*-Domäne, 13  
pET28a-Vektor, 23  
pH-Optimum, 59, 60  
*Ping-Pong-bi-bi*-Mechanismus, 135  
Plasminogenaktivator, 48  
Protease-katalysierte Peptidsynthese, 8  
Proteasen, 42  
Proteinkonzentration, 132  
Proteinmodifizierung, 41, 90, 92  
proteolytischer Abbau, 91  
pseudo-irreversible Hemmung, 27  
PSIPRED, 32  
pST-Vektor, 23, 131  
pYT-Vektor, 23, 45, 131
- R**  
Racemisierung, 4  
RAMACHANDRAN-Diagramm, 29  
RAMAN-Spektroskopie, 77  
RCSB PROTEIN DATA BANK, 3  
Reaktionsisotherme, 34  
reverse Proteolyse, 6, 23  
RGT-Regel, 60  
Ribosom, 3  
Ribozym, 3  
RNase A, 11  
Röntgenkristallstrukturanalyse, 31
- S**  
 $S_N2$ -Reaktion, 86  
*Saccharomyces cerevisiae*, 23, 48

Salzbrücke, 57  
SBTI, 46, 48  
 $\beta$ -Schleife, 49, 58  
Schlüssel-Schloss-Prinzip, 27  
SDS-PAGE, 26, 131  
Sec-Weg, 13  
Sekundärhydrolyse, 10, 38, 39, 41, 42, 81, 88, 90,  
92  
Sekundärstruktur, 31, 54  
Sekundärstrukturelemente, 133  
Selektivität, 33, 37, 59, 61, 62, 64  
Selektivitäts-Screening, 32  
Sequenzanalyse, 42  
Serin-Protease, 48  
Signalpeptiden, 42  
*S-N*-Acetylcysteamin, 14  
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, 24  
Sortase, 11, 12  
Spezifität, 34  
Spezifitätskonstante, 84  
Splice-Mechanismus, 4  
Spontanhydrolyse, 27  
Strukturelemente, 55  
*Subsite-Mapping*, 135  
Substratanpassung, 8  
Substratmimetika, 33, 59, 64–66  
Substratmimetikakonzept, 8, 10, 96  
Substratselektivität, 61  
Substratspezifität, 61  
Surfactin-thioesterase, 16  
Surfactin-Thioesterase-Domäne, 14

**T**

Temperaturoptimum, 59, 60  
tetrahedraler Komplex, 78  
tetrahedrales Intermediat, 14, 16–18, 35, 51, 70,  
71, 73, 76  
theoretische Sekundärstrukturelemente, 55  
thermische Denaturierung, 60  
thermodynamisch kontrollierte Proteolyse, 6  
Thioesterase, 11, 13, 16, 18, 86, 95  
Aktivität, 45  
Thiol-Nachweise, 30  
TLCK, 49, 50, 54, 133  
Totalsynthese, 4  
Transferase, 95  
Transpeptidase-Aktivität, 12  
*Trimeresurus stejnegeri*, 48  
Trypsinogen, 24, 57, 58

**V**

Vancomycin, 13  
Vierfachtrypsinvariante, 11  
v-S-Charakteristik, 34, 135

**W**

Wasserstoffbrückengeflecht, 76

**Z**

Zyklisierungsreaktion, 13

# Publikationen

1. Poster bei dem Clustertreffen „Biowissenschaftliches Netzwerk - *Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung*“ am 3./4. März 2010 in Halle mit dem Titel „*Site-specific in vitro and in vivo modification via enzym catalysis*“
2. Vortrag und Poster bei der Gesamtarbeitsbesprechung des „Biowissenschaftliches Netzwerk - *Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationverarbeitung*“ am 24. März 2009 in Halle mit dem Titel „*Site-specific in vitro and in vivo modification via enzym catalysis*“
3. FRANKE, L ; LIEBSCHER, S ; BORDUSA, F: Engineering the oxyanion hole of trypsin for promoting the reverse of proteolysis. In: *Journal of Peptide Science* 20 (2014) Februar Nr. 2 S.128-136