

Untersuchungen zur Optimierung der Serinprotease Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthese

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Diplom-Biologin Kathrin Rall
geb. am: 27.01.1971 in: Dessau

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Fischer
2. Prof. Dr. Neubert
3. Prof. Dr. N. Sewald

Halle (Saale), 07.04.2004

Tag der Verteidigung: 28.06.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007042

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007042>]

Bibliographische Beschreibung

Rall, Kathrin

Untersuchungen zur Optimierung der Serinprotease Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthese

Universität Halle, Diss.,

124 S., 220 Lit., 30 Abb., 20 Tab.

Referat:

Die vorliegende Dissertation befaßt sich mit der Optimierung des anionischen Rattentrypsin II für die enzymatische Peptidsynthese auf der Basis des Substratmimetika-Konzeptes. Schwerpunkt der Arbeit war zum einen die hierfür notwendige Verbesserung des Verhältnisses von Esterase-/Amidaseaktivität ausgehend vom nativen Katalysator. Im Mittelpunkt der durch ortsgerichtete Mutagenese vorgenommenen Modifizierungen standen verschiedene Strukturbereiche des anionischen Rattentrypsins, die sowohl die katalytische Triade, die primäre Bindungstasche, die S_1 -Bindungsregion sowie jene Aminosäuren einschließen, die in den Konformationswechsel vom Präcursor zur korrespondierenden Protease involviert sind.

Im Hinblick auf die Entwicklung einer spezifitätsunabhängigen Ligationstrategie erfolgten weiterhin Untersuchungen zur Übertragung des Substratmimetika-Konzeptes auf gentechnisch hergestellte Trypsinogen- bzw. Trypsin-Varianten. Aus einer Bibliothek von Substratmimetika mit variabler Abgangsgruppe konnten für die Trypsin-Varianten Präferenzen für bestimmte Abgangsgruppenstrukturen ermittelt werden. Basierend auf diesen Befunden erfolgten weiterhin Acyltransferexperimente, die Rückschlüsse auf die relative Amidaseaktivität der neuen Katalysatoren zuließen.

Die aus den Versuchen als bislang optimal hervorgehende Variante *Trp D189K/K60E* wurde weiterhin enzymologisch charakterisiert. Unter Verwendung dieses neuen Enzyms gelang erstmals eine Trypsin-katalysierte Verknüpfung von im P_1 -Rest D-konfigurierten 4-Guanidinophenylestern auf Acylakzeptoren mit sensitiven Spaltstellen. Darüber hinaus konnte das synthetische Potential der Variante *Trp D189K/K60E* in ausgewählten Segmentligationen bei der Herstellung von Polypeptiden und für die selektiv N-terminale Modifizierung von Peptiden und Proteinen wie Ribonuklease und *E.coli* Parvulin 10 beschrieben werden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil	
2.1. Grundlagen der Proteasekatalyse	9
2.1.1. Katalysemechanismus von Serinproteasen	9
2.1.2. Protease-katalysierte Acyltransferreaktionen	11
2.2. Strategien zum Design einer „Peptidligase“ ausgehend von Trypsin bzw. Trypsinogen	17
2.2.1. Modifizierung von Ser ¹⁹⁵ und His ⁵⁷ der katalytischen Triade	18
2.2.2. Zymogene und Zymogen-ähnliche Trypsin-Varianten	19
2.2.3. Modifizierung der S ₁ -Bindungstasche	22
2.2.3.1. Austausch von Asp ¹⁸⁹	23
2.2.3.2. Trypsin-Varianten mit Elastase-ähnlicher S ₁ -Bindungsregion	25
2.2.3.3. Eliminierung der Disulfidbrücke zwischen Cys ¹⁹¹ und Cys ²²⁰	27
2.2.4. Modifizierung der S ₁ '-Bindungsregion	27
3. Ergebnisse und Diskussion	
3.1. Testsysteme zur Charakterisierung von Trypsin-Varianten	29
3.1.1. Hydrolysestudien unter Verwendung verschiedener Substratmimetika	29
3.1.2. Beurteilung der Amidaseaktivität mittels ausgewählter Modellreaktionen	32
3.2. Untersuchungen zum Substratmimetika-vermittelten Acyltransfer katalysiert durch Trypsin- bzw. Trypsinogen-Varianten	34
3.2.1. Trypsin-Varianten mit Modifizierung von Ser ¹⁹⁵ und His ⁵⁷ der katalytischen Triade	34
3.2.2. <i>Trypsin D189S</i> und abgeleitete Varianten	36
3.2.3. Zymogene und Zymogen-ähnliche Trypsin-Varianten	41
3.2.3.1. Zymogene	41
3.2.3.2. Trypsin-Varianten mit partieller Zymogenkonformation	41

3.2.4.	Trypsin-Varianten mit modifizierter S ₁ -Bindungstasche	48
3.2.4.1.	Eliminierung der Disulfidbrücke Cys ¹⁹¹ -Cys ²²⁰ in <i>Trp C191A</i>	48
3.2.4.2.	Trypsin-Varianten mit Elastase-ähnlicher S ₁ -Bindungsregion	51
3.2.4.3.	Trypsin-Varianten mit basischer Aminosäure in Position 189	58
3.3.	Enzymologische Charakterisierung der Variante <i>Trp D189K/K60E</i>	65
3.3.1.	Bestimmung kinetischer Parameter der Hydrolyse ausgewählter Ester- und Amidsubstrate	65
3.3.2.	Einfluß des P ₁ -Restes in Substratmimetika-vermittelten Acyltransferreaktionen	79
3.3.3.	Einfluß der P ₁ '-Aminosäure auf die Acyltransfereffizienz	82
3.4.	Anwendung von <i>Trp D189K/K60E</i> in Segmentligationen und der selektiv <i>N</i> -terminalen Modifizierung von Peptiden und Proteinen	84
3.4.1.	Substratmimetika-vermittelte Segmentligationen	84
3.4.2.	Selektiv <i>N</i> -terminale Modifizierungen von Peptiden und Proteinen	86
4.	Zusammenfassung	98
5.	Experimenteller Teil	
5.1.	Allgemeine experimentelle Bedingungen	103
5.2.	Konstruktion, Expression und Reinigung von Trypsin- bzw. Trypsinogen-Varianten	103
5.2.1.	Ortsgerichtete Mutagenese	104
5.2.2.	Subklonierung	105
5.2.3.	Hefe-Transformation und Selektion	106
5.2.4.	Isolierung und Reinigung der Trypsinogen-/Trypsin-Varianten	107
5.2.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration	108
5.3.	HPLC-Analytik	108
5.4.	Enzym-katalysierte Reaktionen	109
5.4.1.	Hydrolysereaktionen	109
5.4.2.	Acyltransferreaktionen	109
5.4.3.	Bestimmung enzymkinetischer Parameter	110

5.5.	<i>N</i> -terminale Modifizierung von R-Insulin und <i>E. coli</i> Parvulin 10	111
5.6.	<i>N</i> -terminale Modifizierung von RNase A	111
5.6.1.	Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp-vermittelter Acyltransfer	111
5.6.2.	Affinitätschromatographie mit monomerem Avidin	112
5.6.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	113
5.6.4.	Sequentieller Verdau der modifizierten RNase A	113
5.6.5.	RNase A Aktivitätstest	114
5.7.	Moleküldynamische Berechnungen	114
6.	Literaturverzeichnis	115

Abkürzungen

A	Absorption
Abz	2-Aminobenzoyl
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AMC	Aminomethylcoumarin
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
Bio	Biotinyl
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
Cam	<i>p</i> -Carboxamidomethyl
Cap	<i>p</i> -Carboxamidophenyl
Cp	<i>p</i> -Carboxyphenyl
D	Dalton
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTT	Dithiotreitol
EA	Esterabgangsgruppe
Et	Ethyl
gef.	gefunden
Gp	4-Guanidinophenyl
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
Ind	2-Carboxy-1 <i>H</i> Indol-5yl
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight
Me	Methyl
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholin)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie

MW	Molecular Weight
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p	Partitionswert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ph	Phenyl
Pic	Picolyl
pNA	<i>p</i> -Nitroanilid
R	Alkylrest
RP	Reversed Phase
S	Substrat
SBTI	Soybean Trypsin Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPhOH	Thiohydroxyphenyl
TFA	Trifluoressigsäure
Tgn	Trypsinogen
TLCK	<i>N</i> ^α -Tosyl-L-lysin-chlormethylketon
Trp	Trypsin
wt	Wildtyp
Xaa	Individuelle Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl

Die verwendeten Drei- und Einbuchstaben-Codes der Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB- Kommission für biochemische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem.* 138, 9-37 (1984)].

1. Einleitung

Noch in den frühen 1970er Jahren war die Gewinnung von Proteinen ausschließlich auf solche Spezies beschränkt, die sehr häufig im entsprechenden biologischen Material vorkamen. Derartige Hauptproteine, die in der Regel mehr als 1% des gesamten Zellproteins ausmachen, ließen sich ausgehend von mehreren hundert Gramm Ausgangsmaterial zumeist durch Einsatz chromatographischer Verfahren wenn auch häufig nur sehr aufwendig im Milligramm-Maßstab isolieren und nachfolgend hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion charakterisieren. Zu diesen zählen beispielsweise Hämoglobin, Immunoglobulin, Lysozym und auch die Serinprotease Trypsin. Äußerst schwierig, wenn nicht gar unmöglich, war dagegen die Isolierung solcher Proteine, die nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen, jedoch den weitaus größten Teil der Proteine in einer lebenden Zelle darstellen. Deren Existenz ließ sich bestenfalls indirekt erahnen. Details hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion blieben dagegen verborgen und schienen fernab jeglicher Zugänglichkeit. Eine mehr als einhundertjährige Forschung, beginnend mit der erstmaligen Isolierung von DNA durch MIESCHER im Jahre 1864 bis zur Entwicklung von Grundtechniken der DNA-Klonierung durch BOYEN, COHEN und BERG in den Jahren 1972-1973, legte den Grundstein für eine Reihe von Verfahren, die heute als DNA-Rekombinations-Technik bekannt ist [ALBERTS et al., 1990]. Diese Technik ermöglicht erstmals einen direkten Zugriff auf das genetische Material, dessen detaillierte chemische Charakterisierung und seine nahezu unbegrenzte Vervielfältigung. Durch Variation der gleichen Verfahren kann ein isoliertes Gen praktisch nach Belieben verändert und zurück in kultivierte Zellen gebracht durch selbige überexprimiert werden. Dieser Technik ist es letztendlich zu verdanken, daß nicht nur die Funktion und Struktur vieler, lediglich in geringer Konzentration vorkommender Proteine enträtselt, sondern auch durch den Austausch einzelner Aminosäuren gezielt manipuliert werden konnte. Gleichzeitig bilden diese Verfahren das methodische Fundament für unser heutiges Wissen über die Zusammenhänge von Struktur und Funktion von Proteinen, den Gesetzmäßigkeiten bei deren Faltung und Entfaltung oder auch den Grundlagen enzymatischer Aktivität. Wie praktisch jede Methodik, so ist jedoch auch die DNA-Rekombinations-Technik nicht frei von Limitation. So lassen sich kleinere Proteine bis ca. 30 kDa in der Regel leichter und effizienter exprimieren als solche, die aus mehreren Domänen bestehen und deren korrekte Faltung oftmals eine Herausforderung darstellt. Ein weiteres mögliches

Problem stellt die Bildung heterogener Produkte dar, die durch unkontrolliertes Processing in der Zelle entstehen können. Zudem ist die Expression von zelltoxischen Proteinen in ihrer nativen Form, wie z.B. von aktiven Proteasen, häufig mit Schwierigkeiten verbunden [CLENLAND & CRAIK, 1996]. Unabhängig von der Länge und Art des zu exprimierenden Proteins stellt darüber hinaus der auf die 20 codierten Aminosäuren beschränkte genetische Code eine prinzipielle Limitation rekombinanter Techniken dar. Unter Verwendung auxotropher *E. Coli* Stämme ist es jedoch in den letzten Jahren gelungen, auch nicht-codierte Aminosäuren in Proteine einzuführen [BUDISA et al, 1998; BUDISA et al., 1999; BAE et al., 2001; RENNER et al., 2001; BUDISA et al., 2002; KUCK et al., 2002; BAE et al., 2003]. Dabei ähnelt allerdings die Struktur der eingebauten nicht-natürlichen Aminosäuren in der Regel den natürlichen Analoga. Ursache hierfür ist die nur in Grenzen ausgeprägte Substratflexibilität der für die Synthese entsprechender Aminoacyl-tRNA Bausteine verantwortlichen Synthetasen. Bemühungen zur weiteren Erhöhung der Variabilität rekombinanter Methoden für den Einbau nicht-codierter Aminosäurederivate durch eine zellfreie Synthese brachten kaum Erfolge [HECHT, 1992; MENDEL et al., 1995]. Dies ist zum einen bedingt durch häufig nur geringe Ausbeuten und zum anderen durch die generell limitierte Kompatibilität vieler nicht-natürlicher Aminosäuren mit den Spezifitätsanforderungen des ribosomalen Proteinbiosynthese-Apparates [CORNISH et al., 1995; BARRETT et al., 1999].

Die chemische Synthese besitzt insofern Vorteile gegenüber den molekularbiologischen Methoden der Proteinproduktion, als daß hierdurch praktisch alle nicht-proteinogenen bzw. derivatisierten Aminosäuren wie auch nicht-aminosäureartigen Bausteine unabhängig von ihrer individuellen Struktur in Polypeptide gezielt eingebaut werden können. So gewährleistet die schrittweise Festphasenpeptidsynthese, aber prinzipiell auch die klassische Synthese in Lösung, den mittlerweile routinemäßigen Zugang zu derartigen Polypeptiden mit einer Kettenlänge von bis zu ca. 50 Aminosäure-Resten [GUTTE & MERRIFIELD; 1971; KENT, 1988; SAKAKIBARA, 1995; BORGIA & FIELDS, 2000]. Doch auch unter Verwendung modernster Syntheseautomaten ist ein aufwendiger Seitenkettenschutz trifunktioneller Aminosäuren für eine erfolgreiche Synthese unerlässlich [JAKUBKE, 1996]. Oft zeigt sich hierbei, daß umfangreich geschützte Peptidketten in den für die chemische Synthese gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln zum Teil nur schlecht löslich sind bzw. mit zunehmender Länge zur Aggregation neigen. Dies führt

oft zu langsamen und unvollständigen Reaktionen und in deren Folge häufig zu verminderten Ausbeuten [KENT, 1980; KIYAM et al., 1984; GATOS et al., 1999]. Während die konventionellen rekombinanten Expressionsmethoden praktisch auf die 20 codierten Aminosäuren beschränkt sind, ist somit die chemische Synthese limitiert auf relativ kurze Polypeptide. Um dennoch in den Längenbereich von aktiven Proteinen vorstoßen zu können, wurden eine Reihe von Verfahren zur Kondensation chemisch aufgebauter Peptidfragmente entwickelt. Weiterhin bieten diese Techniken häufig den Vorteil, neben rein chemisch synthetisierten Fragmenten auch gentechnisch hergestellte Polypeptide in Kombination zu verknüpfen und eröffnen somit einen effizienten Zugang zu neuartigen und artifiziellen Proteinspezies.

Für die Verknüpfung längerer Peptidfragmente stehen prinzipiell mehrere Methoden zur Verfügung [DAWSON & KENT, 2000; TAM et al., 2001], wobei insbesondere die von WIELAND (1953) bzw. BRENNER (1957) entwickelte und von DAWSON (1994) optimierte „native chemical ligation“, die darauf aufbauende „expressed protein ligation“ [MUIR, 2001] sowie die Staudinger Ligation [NILSSON et al., 2000] hervorzuheben sind. Eine Vielzahl von Publikationen belegen die gegenwärtige praktische Relevanz dieser Ligationsstrategien für die Proteinsynthese [EVANS et al., 1998; HACKENG et al., 1999; MUIR et al., 1998; SAXON & BERTOZZI, 2000; MUIR, 2001; HONDAL et al., 2001; ARNOLD et al., 2002; KIICK et al., 2002; KOCHENDÖRFER et al., 2003; PÁL et al., 2003]. Obgleich in den letzten Jahren Versuche zur Erhöhung der Flexibilität sowohl der „native chemical ligation“ als auch der „expressed protein ligation“ unternommen wurden [CANNE et al., 1996; OFFER & DAWSON, 2000], bleibt deren Anwendung jedoch praktisch auf die Verknüpfung *N*-terminal Cystein- bzw. Cysteinanalog-enthaltender Peptidakzeptorkomponenten beschränkt. Einer vergleichbaren Limitation unterliegt auch die Staudinger-Ligation, die zur Vermittlung einer chemoselektiven Kondensationsreaktion der Verwendung *N*-terminal mit einer Azid-Gruppierung modifizierter Peptidakzeptoren bedarf.

In diesem Zusammenhang stellt die enzymatische Peptidbindungsknüpfung unter Ausnutzung des reversen Hydrolysepotentials von Proteasen eine attraktive Alternative dar. Hierbei ist die *N*-terminale Sequenz der Peptidakzeptorkomponente nicht zwangsläufig an eine bestimmte Aminosäure bzw. zusätzliche funktionale Gruppierung gebunden. Ursache hierfür ist die für diesen Substratbereich flexible Spezifität dieser Enzyme, wobei bedingt durch die hohe Regio- und Stereospezifität von Proteasen dennoch in der Regel Isomeren reine Produkte gebildet werden.

Hinzu kommt, daß derartige Reaktionen, da sie katalytisch verlaufen, rascher zum gewünschten Produkt führen als analoge unkatalysierte Umsetzungen. Auf Grund dieser Vorteile und den insbesondere in den letzten Jahren erzielten Fortschritten bei der Anwendbarkeit und Effizienz dieser Biokatalyse-Methode findet die Verwendung von Proteasen vor allem für die Kondensationen seitenkettenungeschützter Peptidfragmente aber auch für die selektive Modifizierung von Polypeptiden zunehmende Beachtung [BORDUSA, 2002]. So gelang z.B. die Darstellung von Ribonuklease A in ihrer nativen wie auch chemisch modifizierten Form durch sechs aufeinander folgende Segmentverknüpfungen mittels gentechnisch modifiziertem Subtilisin („Subtiligase“) [JACKSON et al., 1994]. Dieses zum jetzigen Zeitpunkt sicher eindrucksvollste Synthesebeispiel offenbart jedoch nicht nur die prinzipielle Leistungsfähigkeit dieser Methode, sondern auch deren Unzulänglichkeiten. So war es trotz des Einsatzes von „Subtiligase“ notwendig, die Ligationsstellen auf das Spezifitätsprofil dieser Protease-Variante zurechtzuschneiden um produktive Wechselwirkungen insbesondere der Acyldonorkomponenten mit der S₁-Bindungsregion zu garantieren (Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER, 1967). Diese Primärspezifität des Enzyms entscheidet bei Verwendung von Wildtyp-Proteasen gleichzeitig über mögliche proteolytische Nebenreaktionen, die sowohl zur Spaltung der Synthesefragmente als auch des Ligationsproduktes führen können. Eine weitere Restriktion besteht darin, daß nicht-codierte Aminosäuren bzw. nicht-proteinogene Bausteine vor allem in direkter Nachbarschaft zur Ligationsstelle nicht notwendiger Weise Substrate von Proteasen sind und nur in Ausnahmefällen verknüpft werden können. Um die genannten Nachteile Protease-katalysierter Ligationsreaktionen zu minimieren, wurden zahlreiche Manipulationen im Rahmen von Medium-, Enzym- und Substratengineering-Studien durchgeführt [BORDUSA, 2002]. Als eine der bislang effizientesten Strategie zur Umgehung des Spezifitätsproblems stellte sich dabei der Einsatz einer speziellen Form von Substratestern heraus. Diese als sog. „Substratmimetika“ bezeichneten Acyldonorkomponenten reagieren unabhängig von der jeweiligen individuellen S₁-Bindungsortspezifität des Enzyms und vermitteln hierdurch unspezifische Peptidbindungsknüpfungen. Dieses Verhalten basiert auf einer charakteristischen Erkennung von Substratmimetika, die nicht wie bei konventionellen Estern über die C-terminale Aminosäure sondern über die spezifische Esterabgangsgruppe erfolgt (s. Abb. 1).

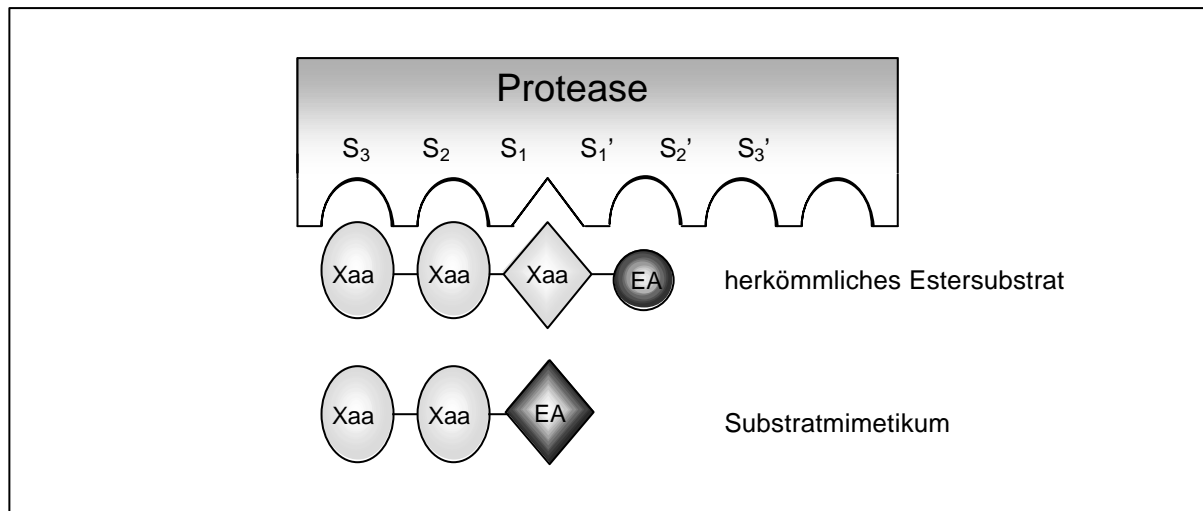



Abb. 1: Allgemeines Schema der Einbindung und Struktur von Substratmimetika und konventionellen Estersubstraten. EA = Esterabgangsgruppe;  Spezifitätszentrum

Das Prinzip der „Substratmimetika“-vermittelten Peptidsynthese wurde erstmals unter Verwendung von 4-Amidinophenyl- (OAm) und 4-Guanidinophenylestern (OGp) etabliert. Es konnte gezeigt werden, daß diese Ester als Substratmimetika für die natürlicherweise Arginin-spezifische Protease Trypsin fungieren, die diese als Substrate akzeptiert und unabhängig von der jeweiligen Aminosäuresequenz im Acylrest umsetzt [SCHELLENBERGER et al., 1991; SEKIZAKI et al., 1996; 1997; 1998; BORDUSA et al., 1997; THORMANN et al., 1999]. In weiterführenden Studien gelang es, das Substratmimetika-Konzept auch auf andere Arginin-spezifische Serin- (Thrombin) und Cysteinproteasen (Clostripain) [SEKIZAKI et al., 1999a; 1999b; 2000; BORDUSA et al., 1997], auf Glutaminsäure-spezifische Proteasen (V8 Protease und GSE) [WEHOFSKY & BORDUSA, 1998; WEHOFSKY et al., 2000] sowie auf α -Chymotrypsin [GÜNTHER et al., 2000; WEHOFSKY et al., 2000] und Subtilisin Savinase [PÖHLMANN, 2000], die beide eine Spezifität für aromatische Aminosäuren besitzen, zu übertragen. Dabei konnte u.a. gezeigt werden, daß vermittelt durch die spezifische Esterabgangsgruppe auch Acyldonorester mit C-terminalem Prolin bzw. nicht-codierten Aminosäuren wie z.B. D-Alanin und β -Alanin in der normalerweise spezifisch erkannten P₁-Position verknüpft werden können. Darüber hinaus gelang es sogar, nicht-peptidische Carboxylkomponenten sowohl in Peptide als auch in nicht-aminosäureartige Aminokomponenten einzubauen [GÜNTHER & BORDUSA, 2000]. Auf der Akzeptanzvermittlung gänzlich nicht-peptidischer Acyldonorkomponenten basiert auch eine weitere interessante

Anwendung von Substratmimetika, die eine Einführung von Schutz- und Reportergruppen in Peptide ermöglicht [WEHOFSKY, 2000]. Im Gegensatz zu rein chemischen Verfahren laufen derartige Modifizierungsreaktionen jedoch absolut selektiv für die *N*-terminale Aminofunktion ab. Zusätzliche Acylierungen, insbesondere der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten, wie sie bei unkatalysierten Reaktionen unter Verwendung konventioneller Aktivester auftreten, wurden dagegen nicht beobachtet. Neben der Synthese und Modifizierung von linearen Peptiden [BORDUSA et al., 1997; CEROVSKY et al., 2000; WEHOFSKY, 2000] eröffnet die Verwendung eines neuartigen Iso-Typs von Substratmimetika aber auch einen Zugang zu sowohl Glutaminsäure- als auch Asparaginsäure-abgeleiteten Isopeptiden [WEHOFSKY et al., 2000]. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurden Substratmimetika gleichen Typs darüber hinaus als Edukte für die Darstellung von Neo-Peptidoglycanen eingesetzt [WEHOFSKY et al., 2002]. Die dabei verwendete Protease Clostripain fungierte bei diesen Synthesen als selektiver Katalysator, der die Verknüpfung der Carbonsäurefunktion der Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Seitenkette, wie auch die des C-Terminus, mit der Aminofunktion der jeweiligen Zuckerkomponente vermittelt. Die gezeigten Synthesebeispiele belegen deutlich die außerordentliche Flexibilität und Effizienz dieser neuartigen Ligationstrategie. Dennoch muß kritisch angemerkt werden, daß bei isolierter Anwendung des Substratmimetika-Konzeptes bedingt durch den Einsatz von Wildtyp-Proteasen das Risiko proteolytischer Nebenreaktionen in wäßrigen Systemen naturgemäß bestehen bleibt. Eine interessante Ausnahme hiervon konnte im Fall der V8 Protease kürzlich in unserem Arbeitskreis für ein Wildtyp-Enzym beobachtet werden [WEHOFSKY, 2000]. Dabei wurde gezeigt, daß eine Inkubation des Enzyms mit einem Überschuß an Thioglycolsäure zu massiven Änderungen der Aktivität wie auch der Spezifität des Katalysators führt, in deren Folge irreversible und spezifitätsunabhängige Peptidsynthesen auch bei Anwesenheit ursprünglich spezifischer Glutaminsäurereste ermöglicht werden. Die molekularen Ursachen dieses Effektes konnten jedoch trotz umfassender Bemühungen bislang nicht aufgeklärt werden. In gleicher Weise scheiterten alle Versuche, dieses Prinzip auf nichtverwandte Proteasen zu übertragen.

Mit der im Arbeitskreis JAKUBKE entwickelten Zymogenkatalyse konnte bereits zu einem früheren Zeitpunkt ein universeller und zunächst sehr erfolgversprechender Ansatz zur Unterdrückung proteolytischer Nebenreaktionen aufgezeigt werden

[JAKUBKE et al., 1996]. Initiale Versuche von ELSNER (2000) zur Nutzung von Trypsinogen als Katalysator für verschiedene Segmentkondensationen bestätigten die prinzipielle Eignung von Zymogenen für die Verknüpfung ursprünglich spaltungssensitiver Peptidfragmente. Auf Grund der außerordentlich geringen enzymatischen Syntheseaktivität und der generell fehlenden Akzeptanz von Substratmimetika sind Zymogene jedoch nur sehr bedingt als Biokatalysatoren nutzbar. Erfolgversprechender ist der gezielte Eingriff in die Struktur einer bekannten Protease. Unabdingbare Voraussetzung für ein rationales Design neuer Biokatalysatoren ist dabei ein ausreichend charakterisierter Wildtyp. Für Enzyme mit bekannter Kristallstruktur führt vor allem die Kombination von ortsgerichteter Mutagenese und Molekular-Modeling zu neuen Enzymen mit verbesserten Synthese-Eigenschaften. Anschauliches und zugleich umfassend bearbeitetes Beispiel hierfür ist Subtilisin, wo beinahe jede Eigenschaft einschließlich Katalyseverhalten, Spezifität, pH-Profil und Stabilität bereits verändert wurde [WONG, 1989; BRYAN, 2000]. Neben Subtilisin ist Trypsin eines der am besten verstandenen Enzyme innerhalb der Serinproteasen. So wurden basierend auf zahlreichen Kristallstrukturen und durch eine Vielzahl chemischer Modifizierungen sowie ortsgerichteter Mutagenese-Studien die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und der zugrunde liegende Katalysemechanismus detailliert charakterisiert und aufgeklärt [PERONA & CRAIK, 1995]. Aufbauend auf diesem Verständnis sollte eine solide Basis für die gezielte Modifizierung von Trypsin vorhanden sein, um den Einsatz dieses Enzyms als „C-N-Ligase“¹ zu optimieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war einerseits die Herstellung von Trypsin-Varianten mit signifikant erhöhtem Verhältnis von Esterase- zu Amidaseaktivität, die andererseits nicht nur Synthesereaktionen ausgehend von herkömmlichen Acyldonorestern sondern insbesondere solche basierend auf geeigneten Substratmimetika katalysieren. Unter dieser Zielsetzung waren Manipulationen am anionischen Rattentrypsin II vorrangig auf Veränderungen der Spezifität bzw. Aktivität des Enzyms ausgerichtet. Die prinzipielle Eignung derartiger Modifizierungen zur Verbesserung der Syntheseigenschaften wurde aus den bereits unter Verwendung von Subtilisin beschriebenen Teilerfolgen zumindest für klassische Acyldonorkomponenten geschlossen [ABRAHMSEN et al., 1991; JACKSON et al.; 1994]. Im Focus der mittels ortsgerichteter Mutagenese erzeugten Modifizierungen standen verschiedene Strukturbereiche des anionischen Rattentrypsins, welche die

¹ abgeleitet von zusammenfügen

katalytische Triade, die primäre Bindungstasche, die S'-Bindungsortregion sowie Aminosäuren, die in den Konformationswechsel vom Präcursor zur korrespondierenden Protease involviert sind, einschließen. Da der Austausch von nur einer Aminosäure nicht zwangsläufig zum gewünschten Biokatalysator führen muß, wurden zum überwiegenden Teil mehrere Aminosäuren schrittweise substituiert. Hierdurch wurden Kombinations-Varianten erzeugt, die in mehreren der genannten Strukturbereiche Modifizierungen aufwiesen. Hintergrund hierfür war die Vermutung, daß ein optimaler Synthesekatalysator erst durch einen additiven Effekt individueller, auf dem Austausch einzelner Aminosäuren basierender Beiträge erhalten werden kann. Die Übertragung des in unserem Arbeitskreis etablierten Prinzips der Substratmimetika-vermittelten Protease-Katalyse auf gentechnisch hergestellte Trypsinogen- bzw. Trypsin-Varianten erfolgte unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung einer spezifitätsunabhängigen und gleichzeitig frei von proteolytischen Nebenreaktionen verlaufenden Ligationsstrategie. Hierzu wurde aus einer Bibliothek von Substratmimetika mit variabler Esterabgangsgruppe zunächst in Hydrolysestudien ein der Spezifität der jeweiligen Trypsin-Variante angepaßtes Substratmimetikum ermittelt. Basierend auf diesen Ergebnissen waren weitere Studien durchzuführen, die unter Verwendung des entsprechenden am besten akzeptierten Estertyps und ausgewählter Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen

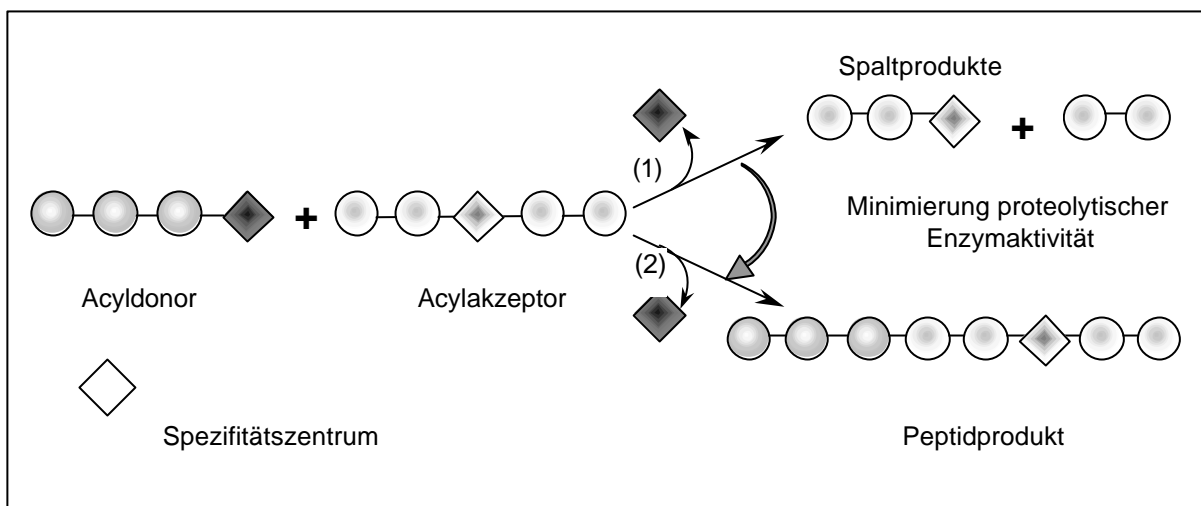


Abb. 2: Schematischer Verlauf von Ligationsreaktionen unter Verwendung von Peptidsubstraten mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch Wildtyp-Trypsin (1) und eine Trypsin-Variante ohne Amidaseaktivität (2).

Rückschlüsse auf die Amidaseaktivität der Proteasen, die idealer Weise fehlen sollte, zuließen (vgl. Abb. 2).

Weiterführend sollte das synthetische Potential der im Hinblick auf Esterase-/Amidaseaktivität und Substratmimetika-Akzeptanz als optimal identifizierten Trypsin-Variante in ausgewählten Peptidligationen und für die selektiv *N*-terminale Modifizierung von Peptiden und Proteinen beispielhaft demonstriert werden.

2. Theoretischer Teil

2.1. Grundlagen der Protease-Katalyse

2.1.1. Katalysemechanismus von Serinproteasen

Trotz der immensen Variabilität der Struktur, Spezifität und biologischen Funktion von Serinproteasen ist die Architektur ihrer katalytischen Maschinerie bestehend aus den drei in die „katalytische Triade“ einbezogenen Aminosäureresten Serin¹⁹⁵, Histidin⁵⁷ und Aspartat¹⁰² (Chymotrypsin-Nomenklatur) abgesehen von sehr wenigen Ausnahmen streng konserviert [DOOSON & WLODAWER, 1998]. Dies betrifft nicht nur die formale Existenz dieser Aminosäurereste selbst, sondern vor allem ihre räumliche Anordnung zueinander, wobei geringe Abweichungen lediglich in der geometrischen Orientierung von Asp¹⁰² in Bezug auf Ser¹⁹⁵ und His⁵⁷ gefunden wurden [LIAO et al. 1992; PERONA et al. 1995]. Die frühen grundlegenden Erkenntnisse über den Mechanismus der Serinprotease-Katalyse stammen bereits aus der Mitte des letzten Jahrhunderts. Die weitere Präzisierung auf molekularer Ebene gelang in den letzten Jahrzehnten durch gezielte chemische, vor allem jedoch gentechnische Modifizierungen und Substitutionen im Bereich der katalytischen Triade, wobei frühere Vorstellungen zum Teil revidiert werden mussten [COREY et al. 1992]. So ist es aus heutiger Sicht exakt das Zusammenspiel der drei katalytisch wirksamen Aminosäurereste nicht als Triade, sondern als Operation zweier funktionaler Diaden, Ser – His und His – Asp, zu interpretieren. Ausschlaggebend hierfür ist die o.g. Tatsache, daß die γ -Carboxylatgruppe von Asp¹⁰² in verschiedenen Positionen relativ zur Ser-His-Diade lokalisiert sein kann, ohne die Aktivität des Enzyms signifikant zu beeinträchtigen [COREY et al. 1992]. Eine Substitution von Asp¹⁰² führt dagegen zur Ausschaltung einer der beiden Diaden, in

deren Folge die katalytische Aktivität um bis zu 4 Größenordnungen sinkt [COREY & CRAIK, 1992]. Einen noch weitaus dramatischeren Effekt besitzt der Austausch von His⁵⁷, der einen funktionalen Verlust beider Diaden bewirkt [COREY & CRAIK 1992; COREY et al. 1992]. Die resultierende Enzym-Variante besitzt nur noch marginale proteolytische Aktivität. Neben der katalytischen Triade stellt das Oxanionloch, welches von Gly¹⁹³ und Ser¹⁹⁵ gebildet wird und die negative Ladung des intermediär entstehenden Oxyanions des tetrahedralen Übergangszustandes stabilisiert, ein weiteres essentielles Element im Katalysemechanismus dar.

Allen Serinproteasen gemeinsam ist deren hydrolytische Aktivität gegenüber Peptid- wie auch Esterbindungen entsprechend ihrer inhärenten Amidase- bzw. Esteraseaktivität für jeweils Enzym-spezifische Substrate. Obgleich Estersubstrate auf Grund höherer Bindungsaktivierung im Allgemeinen schneller und spezifischer umgesetzt werden als analoge Amidsubstrate, folgt die Katalyse in beiden Fällen einem praktisch identischen Mechanismus, der sich formal in den Prozeß der Substratbindung bzw. den nachfolgenden Acylierungs- und Deacylierungsschritt einteilen lässt (s. Abb. 3). Als Folge der höheren Reaktivität von Esterbindungen unterscheidet sich die Hydrolyse ausgehend von Ester- und Amidsubstraten typischer Weise in ihrem jeweils geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. So wird die Gesamtgeschwindigkeit der Esterhydrolyse bedingt durch eine schnellere Acylierung des Enzyms zumeist durch k_3 (Geschwindigkeitskonstante der Deacylierung) und die der Amidhydrolyse in der Regel durch k_2 (Geschwindigkeitskonstante der Acylierung) bestimmt.

Mechanistisch basiert die katalytische Effizienz von Serinproteasen neben der spezifischen Substraterkennung auf einer Kombination aus kovalenter und Säure-

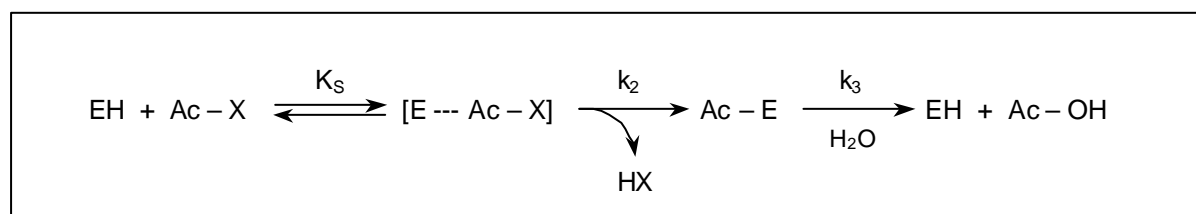


Abb. 3 Kinetisches Modell der von Serinproteasen katalysierten hydrolytischen Spaltung von Ester- und Amidbindungen. EH, freies Enzym; Ac-X, Acyldonor; X = NH-R' bzw. O-R''; HX, Abgangsgruppe; E---A-X, Michaelis-Menten-Komplex; Ac-E, Acylenzym; Ac-OH, Hydrolyseprodukt; k, Geschwindigkeitskonstanten; K, Gleichgewichtskonstanten.

Base-Katalyse unterstützt durch Nachbargruppen- und Orientierungseffekte. Im weiteren Zusammenspiel mit den beiden katalytischen Diaden und dem Oxyanionloch beschleunigen diese Enzyme die Geschwindigkeit von Hydrolysereaktionen um einen Faktor von mehr als 10^9 im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion [KAHNE & STILL, 1988].

2.1.2. Protease-katalysierte Acyltransferreaktionen

Ausgehend von seinen bahnbrechenden Untersuchungen zur Gleichgewichtslehre und der daraus abgeleiteten grundsätzlichen mikroskopischen Reversibilität chemischer Reaktionen postulierte VAN'T HOFF bereits 1898 die Möglichkeit des Einsatzes von Proteasen zur Katalyse der reversen Hydrolysereaktion [VAN'T HOFF, 1898]. In einer gezielten Synthesereaktion von Benzoylglycin mit Anilin unter Verwendung der Serinprotease Papain als Biokatalysator konnte diese Hypothese einige Zeit später durch BERGMANN und FRAENKEL-CONRAT experimentell bestätigt werden [BERGMANN & FRAENKEL-CONRAT, 1937]. Die heute angewandten Protease-basierten Syntheseverfahren lassen sich prinzipiell in zwei Strategien einteilen, wobei die Synthese des zuvor genannten Benzoylglycinanilids durch Papain gleichgewichtskontrolliert erfolgte. Bei dieser, auch thermodynamisch kontrollierte Synthese genannten Reaktionsführung, katalysiert das Enzym die direkte Umkehrung der nativen Hydrolysereaktion einer Peptidbindung. Die Reaktion endet formal mit dem Einstellen des Gleichgewichts [SCHELLENBERGER & JAKUBKE, 1991]. Da dieses sehr weit auf der Seite der Spaltprodukte liegt ist die Synthesereaktion energetisch benachteiligt und führt unter Normalbedingungen nur zu marginalen Produktausbeuten. Bei einer kinetisch kontrollierten Prozeßführung (vgl. Abb. 4) können hingegen die Peptidprodukte in einer signifikant höheren Konzentration als die im thermodynamischen Gleichgewicht vorliegenden erhalten werden. Essentielle Voraussetzung hierfür ist die Fähigkeit von Serinproteasen (EH) intermediär reaktive Acylenzym-Intermediate (Ac-E) auszubilden. Aufgrund der höheren Reaktivität und damit effizienteren Acylierung des Enzyms wird die Carboxykomponente (Ac-X) hierbei vorzugsweise als Ester eingesetzt. Der Wert dieser Reaktionsführung für die Peptidsynthese besteht darin, daß dieses Intermediat nicht nur durch Wasser, sondern auch durch andere zugesetzte Nukleophile (HN), wie z.B. N^2 -Aminofunktionen zugesetzter Peptide, unter Ausbildung einer neuen Peptidbindung gespalten werden kann (WALSH 1970;

FERSHT 1985). Im Verlauf der als Aminolyse bezeichneten Deacylierung durch die nukleophile Aminokomponente wird zunächst ein Acylenzym-Nukleophil-Komplex ($\text{Ac} - \text{E} \cdots \text{HN}$) ausgebildet, der nachfolgend in das Enzym (EH) und Peptidprodukt ($\text{Ac} - \text{N}$) zerfällt, aber auch kompetitiv einer Hydrolyse unterliegen kann. Charakteristisch für derartige Synthesereaktionen ist daher die Bildung sowohl des gewünschten Peptidproduktes als auch der hydrolysierten Acyldonorkomponente (Ac-OH). Das Verhältnis zwischen beiden Syntheseprodukten entscheidet über die Effizienz der Reaktion und ist eine direkte Funktion des Verhältnisses der Hydrolyse- und Aminolysegeschwindigkeit des Acylenzyms. Des Weiteren muß berücksichtigt werden, daß die im Verlauf der Aminolyse gebildete Peptidbindung erneut durch die Protease gespalten werden kann. Diese als Sekundärhydrolyse bezeichnete Folgereaktion führt somit zu einer Minderung der Ausbeute. Damit ist vor allem dann zu rechnen, wenn der Acyldonorester zum überwiegenden Teil verbraucht ist.

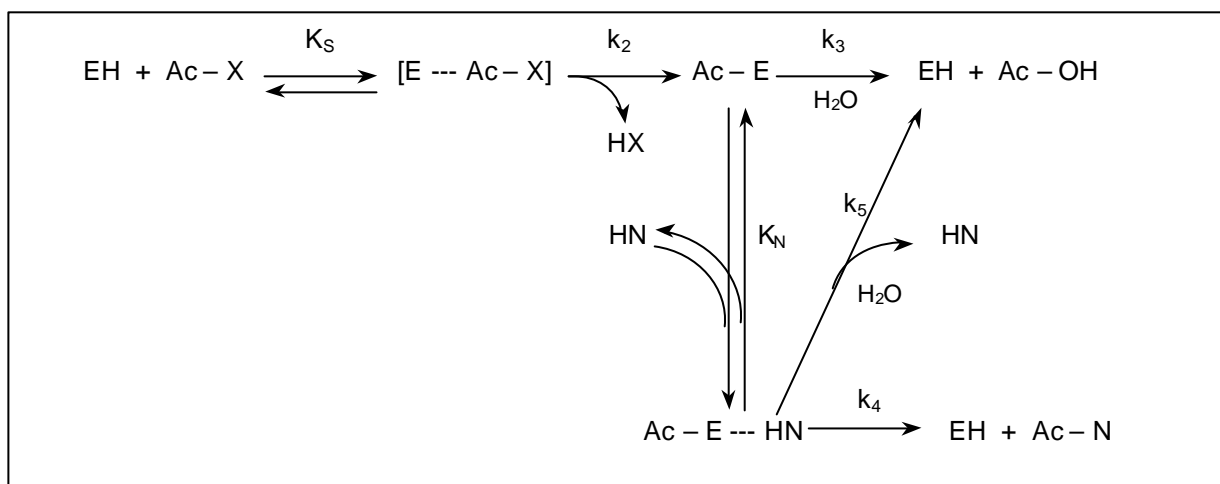


Abb. 4: Kinetisches Modell der Protease-katalysierten Acyltransferreaktion. EH, freies Enzym; $\text{Ac} - \text{X}$, Acyldonor; HX, Abgangsgruppe; $\text{E} \cdots \text{A-X}$, Michaelis-Menten-Komplex; Ac-E , Acylenzym; Ac-OH , Hydrolyseprodukt; HN, Acylakzeptor (Nukleophil); $\text{Ac-E} \cdots \text{HN}$, Acylenzym-Nukleophil-Komplex; Ac-N , Aminolyseprodukt; k , Geschwindigkeitskonstanten; K , Gleichgewichtskonstanten.

Die Effizienz der Deacylierungsreaktion in Richtung Peptidprodukt wird zum einen vom Konzentrationsverhältnis beider konkurrierender Nukleophile und zum anderen durch die Spezifität der $\text{S}'\text{-P}'$ Interaktionen bei der Bindung der nukleophilen Aminokomponente im S' -Bindungsort des Enzyms bestimmt. Zur Abschätzung der zu erwartenden Ausbeute an Peptidprodukt wurde der Partitionswert p eingeführt. In

Anlehnung an das in Abbildung 4 dargestellte kinetische Schema der Protease-katalysierten Acyltransferreaktion gibt der p -Wert das Verhältnis zwischen Aminolysegeschwindigkeit v_A und Hydrolysegeschwindigkeit v_H des Acylenzymintermediates bei konstanter Nukleophilkonzentration nach Gl. 1 wieder [KÖNNECKE et al., 1984]:

$$p = \frac{v_H}{v_A} [\text{HN}] \quad (1)$$

Der Partitionswert kann direkt aus den entsprechenden Konzentrationen an gebildetem Peptidprodukt [Ac-N] und kompetitiv entstandener Säure [Ac-OH] nach Gl. 2 bestimmt werden. Hierbei muß die Nukleophilkonzentration [HN] wesentlich über der des eingesetzten Estersubstrates liegen um über den Reaktionszeitraum als konstante Größe betrachtet werden zu können [KÖNNECKE et al., 1984, SCHELLENBERGER et al., 1990].

$$p = \frac{[\text{Ac-OH}]}{[\text{Ac-N}]} [\text{HN}] \quad (2)$$

Weiterhin ist zu beachten, daß die Deacylierung des Acylenzymintermediates durch die nukleophile Aminokomponente nur durch deren deprotonierte Form erfolgen kann. Der als effektive Nukleophilkonzentration dieser Spezies bezeichnete Anteil im Reaktionsansatz lässt sich entsprechend des Formalismus von Henderson-Hasselbalch nach Gl. 3 berechnen.

$$[\text{HN}]_0 = \frac{[\text{N}]_0}{1+10^{\text{pK}-\text{pH}}} \quad (3)$$

Hierbei entspricht $[\text{HN}]_0$ der deprotonierten Form des Nukleophils, $[\text{N}]_0$ der totalen Nukleophilkonzentration, pK dem pK_a -Wert der α -Aminogruppe der Aminokomponente und pH dem pH -Wert der Reaktionslösung. Durch einen Acyltransfer auf Peptidbibliotheken stellt die Ermittlung des Partitionswertes p einen rationalen Weg zur Charakterisierung der S' -Bindungsortspezifität einer Protease dar [SCHELLENBERGER et al., 1993].

Nachdem die ersten Experimente zum Protease-katalysierten Acyltransfer vor allem der Untersuchung des Katalysemechanismus dienten, steht seit Ende der siebziger Jahre die präparative Nutzung derartiger Reaktionen im Vordergrund [JAKUBKE et al., 1985; KULLMANN, 1987; JAKUBKE, 1987; KASCHE, 1989; CEROVSKY et

al., 2000]. Dabei stellte sich neben der nativen proteolytischen Aktivität die oftmals limitierte Spezifität von Proteasen als eine wesentliche Restriktion für den breiten Einsatz dieser Synthesestrategie heraus. Als Folge hiervon ist eine sorgfältige Planung solcher Reaktionen erforderlich, wobei zum einen die zu ligierenden Segmente möglichst keine Protease-lablen Bindungen enthalten sollten und andererseits die gewählte Ligationsstelle dem Spezifitätsprofil der Protease angepaßt werden muss. Zur Umgehung dieser Limitationen und damit zur Erhöhung der Flexibilität und Universalität Protease-katalysierter Synthesereaktionen stellen Manipulationen an der Acyldonorkomponente einen effizienten Ansatzpunkt dar. Hierzu wurden in den letzten Jahren in unserem Arbeitskreis zahlreiche Untersuchungen mit einem neuen Typ von Acyldonorestern, den sog. Substratmimetika, durchgeführt [vgl. Rev. BORDUSA, 2002]. Aus historischer Sicht kann die Entwicklung der Substratmimetika auf Studien zur zeitabhängigen irreversiblen Inhibition von Trypsin und Trypsin-ähnlichen Enzymen zurückgeführt werden [MARKWARDT et al., 1973; WAGNER et al., 1973]. Ausgehend von der Tatsache, daß neben Benzamidin und Phenylguanin auch Ester der 4-Amidinobenzoessäure und 4-Guanidinobenzoessäure Serinproteasen mit Trypsin-ähnlicher Spezifität inhibieren, wurden von WAGNER und HORN (1973) Carbonsäureester von 4-Amidinophenolen synthetisiert und in Anlehnung an die Ester der Amidinobenzoessäure als „umgekehrte Ester“ bezeichnet (Abb. 5). Während Benzamidin und Phenylguanin das Enzym kompetitiv inhibieren, reagieren beide Estertypen mit den Enzymen unter Ausbildung eines stabilen Acylenzymintermediats und führen folglich zur zeitabhängigen irreversiblen Inhibition

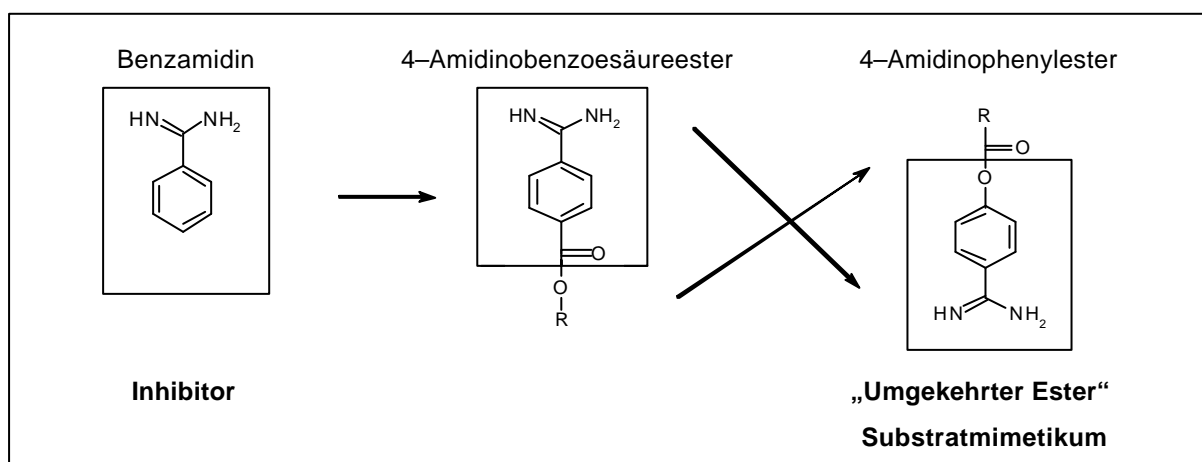


Abb. 5: Die Entwicklung vom kompetitiven Inhibitor zum Substratmimetikum.

der Proteasen. Folgestudien zeigten jedoch, daß unter in vivo Bedingungen eine unspezifische Hydrolyse dieser Ester durch eine Vielzahl von Enzymen erfolgt, wodurch diese Estertypen als selektive Inhibitoren untauglich erschienen.

Das Konzept der Substratmimetika beruht analog auf der gezielten Verschiebung der spezifitätsdeterminierenden Gruppierung von der ursprünglich spezifischen C-terminalen Aminosäure in die Esterabgangsgruppe der Acyldonorkomponente. Als Folge dieser strukturellen Änderung erfolgt die Substraterkennung durch das Enzym nicht basierend auf der in P₁-Position befindlichen Aminosäure, sondern vermittelt durch die spezifitätsangepasste Esterabgangsgruppe [THORMANN et al., 1999]. Dies stand im Gegensatz zu den bis dahin eingesetzten klassischen Abgangsgruppenmanipulationen, die darauf ausgerichtet waren, die Struktur der Esterabgangsgruppe an die Spezifität des S'-Bindungsortes der Protease anzupassen. Hierdurch gelang es zwar die Substrateigenschaften des Acyldonors in gewissem Umfang zu verbessern, allerdings führte dies nicht zur Akzeptanz ursprünglich unspezifischer P₁-Aminosäuren. Demgegenüber vermitteln die spezifischeren Interaktionen der Esterabgangsgruppe mit der spezifitätsbestimmenden S₁-Bindungsstelle auch eine Acylierung des Enzyms mit völlig unspezifischen Acylresten. Der unspezifische Acylrest kann anschließend variabel auf geeignete nukleophile Aminokomponenten übertragen werden, wodurch die Peptidbindungsknüpfung einen universellen Charakter erhält.

Die molekularen Grundlagen der Einpassung von Substratmimetika wurden mit Hilfe von Hydrolyse- und Acyltransferexperimenten, Protein-Ligand-Docking-Studien sowie moleküldynamischen Berechnungen am Modell des Trypsins aufgeklärt und detailliert beschrieben [THORMANN et al., 1999]. Wie von THORMANN et al. gezeigt, binden Substratmimetika verglichen mit herkömmlichen Estersubstraten in entgegengesetzter Orientierung an das Enzym (vgl. Abb. 6). Die spezifische Esterabgangsgruppe belegt dabei die S₁-Bindungstasche. Nach erfolgter Acylierung kann die Deacylierung des Enzyms durch Wasser oder die Aminokomponente erst stattfinden, wenn der Acylrest sich seinerseits in Richtung S-Bindungsortregion umlagert. Hierbei ist die Aminolyse oftmals bevorzugt, da die Aminokomponente im Gegensatz zu Wasser effizienter mit der S₁'-Bindungsregion des Enzyms interagieren kann und damit offenbar das Gleichgewicht zwischen beiden Acylenzym-Intermediaten zu Gunsten der deacylierbaren Spezies verschiebt.

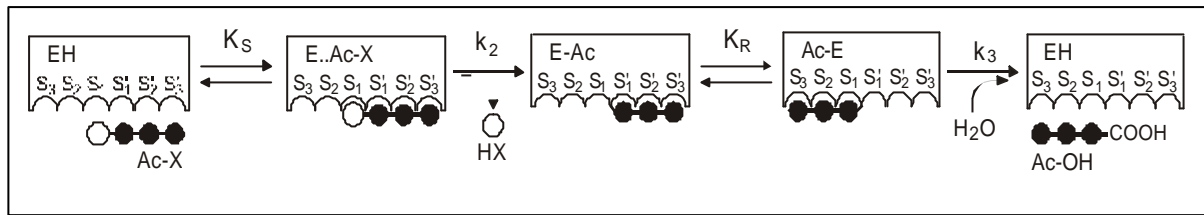


Abb. 6: Erweitertes kinetisches Modell der Protease-katalysierten Hydrolyse von Substratmimetika. EH, freies Enzym; Ac-X, Acyldonor; HX, Abgangsgruppe; E-Ac-X, Michaelis-Menten-Komplex; E-Ac, Acylenzymintermediat mit dem Acylrest im S'-Bindungsort; Ac-E, Acylenzymintermediat mit dem Acylrest im S-Bindungsort; Ac-OH, Hydrolyseprodukt; k, Geschwindigkeitskonstanten; K, Gleichgewichtskonstanten (R..."rearrangement") (THROMANN et al., 1999).

Ogleich sich das Substratmimetika-Konzept als eine effiziente und universelle Strategie zur Umgehung der Primärspezifität des Enzyms erwiesen hat, besteht bei konventioneller Reaktionsführung im wässrigen System unter Verwendung von Wildtyp-Proteasen weiterhin das Risiko unerwünschter proteolytischer Nebenreaktionen. Optimierte Enzyme, deren Amidaseaktivität signifikant vermindert ist, bieten einen interessanten Ansatzpunkt zur Ausschaltung dieser Nebenreaktionen. Diese neuen Biokatalysatoren sollten jedoch gleichzeitig entsprechende Substratmimetika akzeptieren, um eine universelle Anwendung zu gewährleisten. Als Ausgangspunkt für ein Proteindesign bietet sich unter den Serinproteasen Trypsin an, für das mit der Entwicklung der 4-Guanidinphenylester bereits ein sehr effizientes Substratmimetikum existiert [BORDUSA, 2000]. Zudem ist dieses Enzym durch strukturanalytische, kinetische und molekularbiologische Methoden in den letzten Jahren eingehend charakterisiert worden. Vor allem Kenntnisse über die spezifitätsdeterminierenden Bereiche der Protease und die Prozesse während der Zymogenaktivierung sind unabdingbare Voraussetzung zum Festlegen geeigneter Strategien im Rahmen des Enzym-Engineering, die im nachfolgenden Abschnitt vorgestellt werden.

2.2. Strategien zum Design einer „Peptidligase“ ausgehend von Trypsin bzw. Trypsinogen

Die durchgeführten Modifizierungen lassen sich in vier Bereiche untergliedern, welche die katalytische Triade, primäre Bindungstasche, S₁'-Bindungsregion und Aminosäurereste, die zur Stabilisierung der Trypsinogen- bzw. Trypsinogen-ähnlichen Konformation beitragen einschließen. Abbildung 7 zeigt ein Modell des Trypsin, in dem relevante Strukturbereiche bzw. einzelne Aminosäurereste gekennzeichnet sind. In den nachfolgenden Abschnitten wird die Motivation, die zum Festlegen der aufgezeigten Strategien führte, dargelegt.

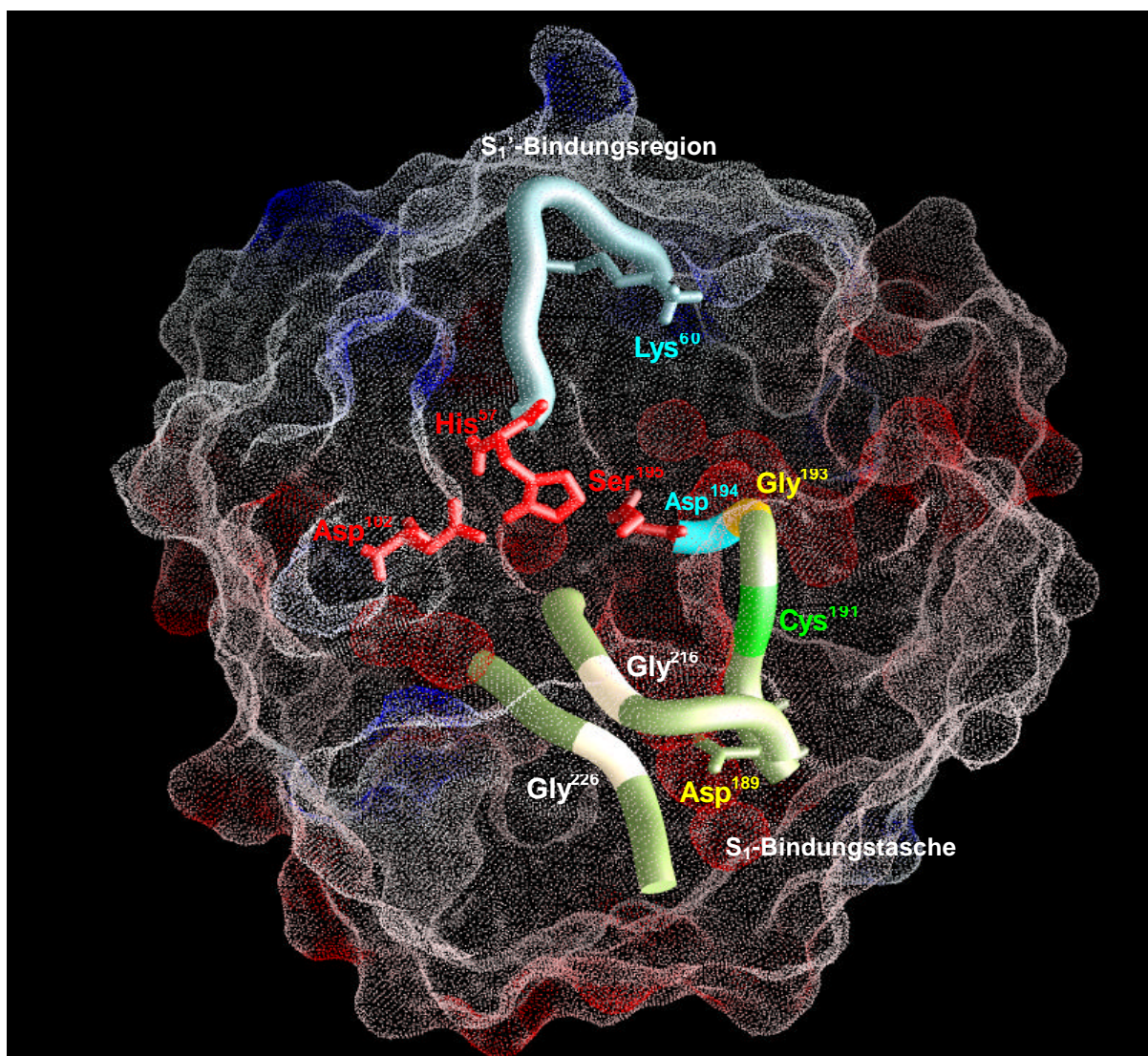


Abb. 7: Die katalytische Triade (His⁵⁷, Asp¹⁰², Ser¹⁹⁵, rot), S₁- Bindungstasche (Reste 189-194, 214-220, 224-228) und S₁'-Bindungsregion (Reste 58-64) von Trypsin. (Grasp-Darstellung; rot: negative Oberflächenladung, blau: positive Oberflächenladung, Dr. R. Günther)

2.2.1. Modifizierung von Ser¹⁹⁵ und His⁵⁷ der katalytischen Triade

Auf Grund der unter 2.1.1. ausgeführten essentiellen Rolle während der Katalyse waren Serin 195 und Histidin 57 Gegenstand intensiver Untersuchungen zum Katalyseverhalten von Serinproteasen. Nicht nur durch ortsgerichtete Mutagenese sondern auch durch chemische Modifizierungen gelang es, die Enzymeigenschaften auch im Hinblick auf synthetische Zielstellungen zu verändern. So führte die chemische Methylierung des e-Stickstoffatoms von His⁵⁷ im Subtilisin aber auch im Chymotrypsin und Trypsin zu Katalysatoren mit einer relativ zur Hydrolyse erhöhten Aminolyse rate des Acylenzym-Intermediates [WEST et al., 1990; WONG et al., 1991]. Die Gründe für die bevorzugte Aminolyse der in der Literatur beschriebenen methylierten Varianten liegen hauptsächlich in der gegenüber Wasser erhöhten Reaktivität des Acylenzymintermediates für die nukleophile Aminokomponente. Eine prinzipielle Anwendbarkeit von Methyl-Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthese konnte durch den Arbeitskreis von TANIZAWA bereits nachgewiesen werden [ITOH et al., 1997]. Allerdings zeigen die am His⁵⁷ methylierten Proteasen neben der verminderten proteolytischen auch eine dramatisch verringerte esterolytische Aktivität, so daß diese Katalysatoren bislang kaum praktische Relevanz erlangten. Erwähnt werden muss allerdings, daß die chemischen Methylierungsreaktionen auf Grund ihrer fehlenden Regiospezifität nicht nur auf His⁵⁷ beschränkt waren, sondern in statistischer Weise auch alle anderen Histidinreste bzw. Lysine im jeweiligen Enzym umfassten. Ein basierend auf derartigen Nebenreaktionen hervorgerufener unspezifischer Effekt auf die Katalyse kann folglich nicht per se ausgeschlossen werden. Demgegenüber besitzen gentechnische Modifizierungen den Vorteil exakter Punktgenauigkeit. In Analogie zu den chemisch methylierten Enzymen führt der selektive Austausch von His⁵⁷ mittels ortsgerichteter Mutagenese ebenfalls zu Katalysatoren, die sich ausnahmslos durch eine signifikant verminderte Amidaseaktivität auszeichnen [COREY & CRAIK, 1992]. Demgegenüber existiert in der Literatur bislang keine Studie zum Verhalten solcher Varianten gegenüber Substratmimetika. Zusammen mit dem Befund, daß bereits das aktive Serin 195 allein eine, wenn auch nur geringe enzymatische Aktivität garantiert, stellt der selektive Austausch von His⁵⁷ gegen Alanin einen interessanten Ansatz zum Design einer vom Trypsin abgeleiteten Substratmimetika-spezifischen Peptidligase dar.

Die direkte Modifizierung des aktiven Serins 195 durch Cystein mittels

ortsgerichteter Mutagenese hat sich bereits beim Subtilisin als eine weitere erfolgreiche Strategie zur Verbesserung der Syntheseigenschaften von Proteasen erwiesen [JACKSON et al., 1994]. Dabei liegt der Vorteil des sog. Thiosubtilisins vor allem in einem signifikant verbesserten Aminolyse/Hydrolyse-Verhältnis, wodurch höhere Produktausbeuten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym erreicht werden konnten. Analog zum Thiosubtilisin wurde untersucht, welchen Effekt dieser Austausch im Trypsin auf Substratmimetika-basierte Synthesereaktionen besitzt. Initiale enzymkinetische Studien weisen die Trypsin-Varianten *Trp S195C* und *Trp S195C/D102N* bereits als Enzyme mit einer signifikant verminderten Amidaseaktivität aus [HIGAKI et al., 1989]. Dies war Motivation zu testen, inwieweit sich *Trp S195C* für irreversible Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthesen eignet.

2.2.2. Zymogene und Zymogen-ähnliche Trypsin-Varianten

Trypsinogen stellt den proteolytisch inaktiven Präkursor des aktiven Trypsins dar und wird durch limitierte Proteolyse im Verlauf einer Aktivierungskaskade in die aktive Protease überführt [KERR et al., 1975]. Das initiale Ereignis bei der Trypsinogenaktivierung ist dabei die proteolytische Abspaltung des *N*-terminalen Oktapeptides Phe-Pro-Val-(Asp)₄-Lys¹⁵ (anionisches Ratten-Trypsinogen II) durch Enteropeptidase oder autokatalytisch durch Trypsin selbst. Ein Vergleich der Röntgenkristallstrukturen von Trypsinogen und Trypsin zeigt, daß als Folge dieser limitierten Proteolyse der neu gebildete *N*-Terminus beginnend mit Ile¹⁶ von der Oberfläche ins Innere des Proteins wandert und ein Ionenpaar mit der ω -Carboxylatgruppe von Asp¹⁹⁴ ausbildet. Durch diese Salzbrücke entsteht ein direkter Kontakt des *N*-Terminus mit der S₁-Bindungstasche (vgl. Abb. 8) [FREER et al., 1970; HUBER & BODE, 1978]. Im Zuge dieser Konformationsänderung wird die im Zymogen bestehende ionische Wechselwirkung zwischen Asp¹⁹⁴ und His⁴⁰ gelöst und es kommt zur korrekten Ausbildung der S₁-Bindungstasche und des Oxyanionlochs. Die für die Stabilisierung des intermediären Oxyanions essentielle Amid-Gruppe des Gly¹⁹³ verändert hierbei ihre Position um mehr als 2 Å in Richtung Substratbindungstasche.

In die weitreichenden Konformationsänderungen während der Zymogenaktivierung sind insgesamt vier im Trypsinogen flexible Peptidsegmente einbezogen [HUBER & BODE, 1978; BRÜNGER et al., 1987]. Diese umfassen die Aminosäurereste 16-19, 142-152, 184-194 bzw. 216-223 und werden auf Grund ihrer

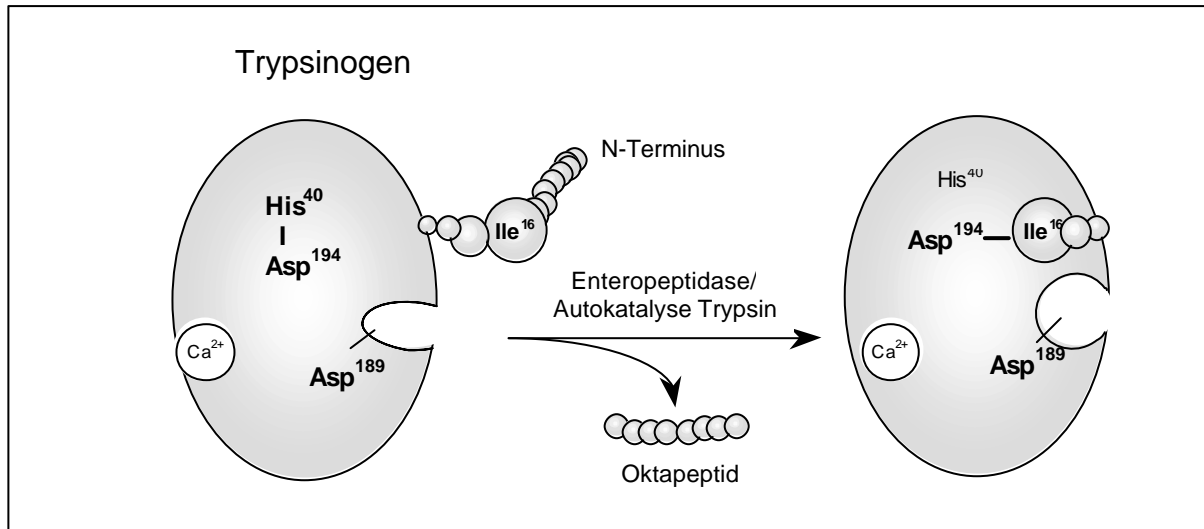


Abb. 8: Schematische Darstellung der Trypsinogen-Aktivierung. (anionisches Rattentrypsin II)

Involvierung in den Aktivierungsprozeß auch als Aktivierungsdomänen bezeichnet. Jene Bereiche schließen sowohl Teile der Substratbindungstasche (Reste 184-190) als auch des Oxanionlochs (Gly¹⁹³) ein und werden erst nach Aktivierung und Ausbildung der Salzbrücke zwischen Ile¹⁶ und Asp¹⁹⁴ flankiert durch hydrophobe Interaktionen der Ile¹⁶-Seitenkette und insgesamt 20 neu entstehenden Wasserstoffbrückenbindungen, die die Aktivierungsdomänen vernetzen, stabilisiert [HEDSTROM et al., 1996]. Das Zymogen existiert nahezu vollständig in einer inaktiven Konformation, kann aber im Komplex mit BPTI, auf Grund der flexiblen Aktivierungsdomänen, eine Trypsin-ähnliche Struktur einnehmen [HUBER & BODE, 1978; HEDSTROM et al., 1996; PASTERNAK et al., 1998].

Der markanteste strukturelle Unterschied zwischen Präcursor und aktivem Enzym besteht in der Anordnung des Restes Gly¹⁹³, der maßgeblich an der für die Katalyse essentiellen Ausbildung des Oxanionlochs beteiligt ist. Neben Gly¹⁹³ weisen aber auch Cys¹⁹¹ und Cys²²⁰, die über eine Disulfidbrücke zwei Segmente der S₁-Bindungstasche miteinander verbinden, und Gly²¹⁹ deutlich unterschiedliche Orientierungen im Präcursor bzw. im aktiven Enzym auf [ELSNER, 2000]. Dennoch sind etwa 85% der Trypsinogen- und Trypsinstruktur identisch [KOSSIAKOFF et al., 1977; FEHLHAMMER et al., 1977]. Dabei überrascht, daß diese Ähnlichkeit auch die Anordnung der katalytischen Triade einschließt. Dies korreliert mit dem Befund, daß das Zymogen selbst, wenn auch nur in geringem Ausmaß, gegenüber

Estersubstraten enzymatische Aktivität besitzt, obgleich es nicht in der Lage ist Peptidbindungen zu spalten [GERTLER et al., 1973; ULLMANN et al., 1994]. Stopped-flow enzymkinetische Studien konnten zeigen, daß die verminderte esterolytische Aktivität hauptsächlich aus verringerten Acylierungsraten resultiert, während die Geschwindigkeit der Deacylierung des Zymogens praktisch der des aktiven Enzyms entspricht [HEDSTROM et al., 1996].

Auf Grund seiner Schlüsselstellung während des Aktivierungsprozesses kann Asp¹⁹⁴ als Determinante der Zymogenizität angesehen werden [PASTERNAK et al., 1998]. Wie Asp¹⁹⁴ in Trypsinogen die inaktive Konformation durch die Salzbrücke zu His⁴⁰ und gleichzeitiger Verzerrung des Oxyanionlochs stabilisiert, so stabilisiert derselbe Rest in Trypsin die aktive Konformation durch die Salzbrücke zu Ile¹⁶. Partiiellen Zymogen-Charakter in aktiviertem Trypsin (abgespaltenes Oktapeptid) erhält man demzufolge durch den Austausch von Asp¹⁹⁴ mit z.B. Asparagin oder Glycin, da hierdurch die Ausbildung der Salzbrücke zum *N*-terminalen Ile¹⁶ unterbunden wird [HEDSTROM et al., 1996; PASTERNAK et al., 1998]. Gleichzeitig führt dieselbe Substitution im Trypsinogen dazu, daß sich die Salzbrücke zwischen Asp¹⁹⁴ und His⁴⁰ nicht mehr ausbilden kann. Somit hat der Austausch von Asp¹⁹⁴ zur Folge, daß Trypsin eine Trypsinogen-ähnliche Konformation annimmt, während Trypsinogen eine Trypsin-ähnliche Struktur ausbildet. Tatsächlich wurde in solchen Trypsinogen-Varianten eine, wenn auch nur leicht erhöhte Aktivität verglichen mit nativem Trypsinogen gefunden [PASTERNAK et al., 1998], während sich in *Trypsin D194N* der partielle Zymogencharakter in einer zum Wildtyp-Enzym verminderten Amidaseaktivität manifestiert. Demgegenüber ist der Einfluß dieser Mutation auf die Esteraseaktivität des Trypsins geringer, wodurch *Trypsin D194N* ein, um eine Größenordnung verbessertes Verhältnis zwischen Amidase- und Esteraseaktivität als das native Wildtyp-Enzym aufweist [HEDSTROM et al., 1996]. Die daraus ableitbare geringere proteolytische Aktivität macht diese Variante zu einem interessanten Kandidaten für eigene Untersuchungen. Ein weiterer wichtiger Aspekt mit Hinblick auf die Übertragung des Substratmimetika-Konzeptes ist die Tatsache, daß *Trp D194N* wegen des vorhandenen Asp¹⁸⁹ weiterhin eine Arginin-Spezifität besitzen sollte, wodurch die ursprünglich für Wildtyp-Enzym entwickelten 4-Guanidinophenylester auch als geeignetes Substratmimetikum für diese Variante fungieren könnten.

Für die Herstellung von Zymogen-Varianten ist die Vermeidung einer

autokatalytischen Aktivierung des Katalysators essentiell. Prinzipiell bieten sich hierfür mehrere Möglichkeiten im Rahmen der ortsgerichteten Mutagenese an [PASTERNAK et al., 1998]. Ein Weg besteht in einer Substitution von Lys¹⁵, das als spezifische Erkennungsaminosäure im initialen Proteolyseschnitt der Zymogenaktivierung fungiert. Interessanter Weise führte ein Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin sogar zu einer Zymogen-Variante, die in der Literatur im Vergleich zum Wildtyp-Zymogen als aktiver beschrieben ist [PASTERNAK et al., 1998]. Damit könnte diese Zymogen-Spezies für Substratmimetika-vermittelte Synthesereaktionen hinreichend aktiv sein und wurde deshalb in eigene Untersuchungen einbezogen. Demgegenüber stehen initiale Ergebnisse mit Wildtyp-Trypsinogen die zeigten, daß ausgehend von Acyldonorestern, deren Abgangsgruppe an die S'-Spezifität des Zymogens angepaßt wurde, Peptidsynthesen zwar grundsätzlich möglich sind, aber nur mit synthetisch wenig relevanter Geschwindigkeit ablaufen [ULLMANN et al., 1994; JAKUBKE et al., 1996]. Durch Abgangsgruppenmanipulationen wurde weiterführend versucht, die bereits erwähnte geringe Acylierungsgeschwindigkeit bei Zymogenen als Ursache für die nur geringen Umsatzraten zu erhöhen [ELSNER, 2000]. Alternativ wurde getestet, daß Substratmimetika-Konzept unter Verwendung von 4-Guanidinophenyl- und Guanidinoalkylestern auf Trypsinogen zu übertragen [ELSNER, 2000]. Beide Ansätze führten jedoch nur zu mäßigem Erfolg. Nachfolgende Molekülmodellierungsstudien zeigten, daß im Gegensatz zu Trypsin das Zymogen nur noch unzureichend in der Lage ist, Trypsin-spezifische Substrate bzw. Substratmimetika mit charakteristischer basischer Seitenkettenfunktion in die S₁-Bindungstasche einzupassen. Vielmehr besitzt Trypsinogen, ähnlich wie Chymotrypsin, eine Spezifität für aromatische Aminosäuren, was bereits in zu einem früheren Arbeiten diskutiert wurde [ANTONINI et al., 1984]. Es sollte nun unter Verwendung eines gentechnisch hergestellten Zymogens überprüft werden, inwieweit Substratmimetika mit aromatischen Esterabgangsgruppen von den Zymogen-Varianten unabhängig vom individuellen Aminosäurerest in P₁-Position akzeptiert werden.

2.2.3. Modifizierung der S₁-Bindungstasche

Wie literaturbekannte Studien gezeigt haben, wirken sich Manipulationen innerhalb der S₁-Bindungstasche von Trypsin in erster Linie auf die Amidaseaktivität aus, während die für Peptidsynthesen benötigte Esteraseaktivität weit weniger

beeinflusst wird [HEDSTROM et al., 1992]. Dies läßt sich damit erklären, daß die Amidhydrolyse generell höhere Ansprüche an die korrekte Einpassung des zu spaltenden Substrates stellt als analoge Esterhydrolysen [HEDSTROM et al., 1992]. Entscheidend zur Aufklärung der strukturellen Determinanten der S₁-Spezifität des Trypsins trugen die von HEDSTROM et al. (1992, 1994a, 1994b) durchgeführten Untersuchungen zur Umwandlung von Trypsin in Chymotrypsin bei. Innerhalb dieser Studien konnte gezeigt werden, daß neben Asp¹⁸⁹, das bereits als die zu den basischen Seitenketten spezifischer Lysin- und Argininreste komplementäre Aminosäure bekannt war, vor allem die Reste 185-188 (Loop 1) und die Reste 221-225 (Loop 2) als strukturelle Determinanten der S₁-Spezifität verantwortlich sind. Die Aminosäuresequenz dieser beiden Segmente differiert zwar zwischen den Vertretern der Trypsine und Chymotrypsine, ist jedoch innerhalb beider Enzymspezies hoch konserviert. Da auch in Elastase diese konservierten Loopstrukturen gefunden wurden ist anzunehmen, daß es sich hierbei um generell für die S₁-Spezifität bedeutsame Bereiche von Serinproteasen handeln könnte. Trypsin weist ebenso wie andere Serinproteasen eine deutlich abgrenzbare S₁-Bindungstasche auf, in welche weitere Sequenzabschnitte, die die Aminosäurereste 189-195, 214-220 und 224-228 umfassen, involviert sind (vgl. Abb. 7). Am Boden dieser Substratbindungstasche befindet sich der bereits erwähnte negativ geladene Asparaginsäurerest 189. Durch die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Asp¹⁸⁹ und der positiv geladenen Seitenkette spezifischer Bindungspartner kommt es zur korrekten Substrateinbindung, zu der auch Ser¹⁹⁰ in geringerem Maße beiträgt. Sowohl Asp¹⁸⁹ als auch Ser¹⁹⁰ ist in allen Proteasen mit Trypsin-ähnlicher Spezifität streng konserviert, ebenso wie das Serin oder andere kleine Aminosäuren in den Klassen der Chymotrypsin-ähnlichen bzw. Elastase-ähnlichen Enzyme, deren Spezifität festgelegt ist auf aromatische bzw. kleine hydrophobe Reste.

2.2.3.1. Austausch von Asp¹⁸⁹

Die Bedeutung von Asp¹⁸⁹ für die Substraterkennung durch Trypsin wurde mit Hilfe von ortsgerichteter Mutagenese [PERONA et al., 1993; GRAF et al., 1988; GRAF et al., 1987; WILKE et al., 1991] sowie genetischer Selektion [PERONA et al., 1993b; EVNIN et al., 1990] intensiv untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß der Austausch dieses Restes zu einer unspezifischen Protease mit geringer Gesamtaktivität und einer im Vergleich zum Wildtyp-Enzym um 4 bis 5 Größenordnungen verringerten

Spezifität gegenüber Trypsin-spezifischen Arginin- und Lysin-enthaltenden Amid-Substraten führt [GRAF et al., 1988]. Dagegen war *Trp D189S*, das in Position 189 komplementär zum Chymotrypsin ein Serin enthält, 10 bis 100 mal aktiver gegenüber Chymotrypsin-spezifischen Amid-Substraten mit Phenylalanin und Tyrosin in P₁-Position als Wildtyp-Trypsin, allerdings ca. 10⁴ mal weniger aktiv als Chymotrypsin [HEDSTROM et al., 1992]. Die Esterase-Aktivität von *Trp D189S* liegt jedoch unter Verwendung aktivierter Thiobenzylestersubstrate mit Phenylalanin in P₁-Position nur um den Faktor 10 unter der von Chymotrypsin, so daß *Trp D189S* ein besseres Esterase/Amidase-Verhältnis aufweist als natives Chymotrypsin [HEDSTROM et al., 1992]. In Kombination mit dem Substratmimetika-Konzept konnte in eigenen Studien bereits nachgewiesen werden, daß Estersubstrate mit einer OPh- bzw. OGP-Abgangsgruppe von *Trypsin D189S* hydrolysiert werden. Es galt nun weiterhin, die bei der Variante *Trp D189S* vorhandene Amidaseaktivität in Substratmimetika-vermittelten Acyltransferreaktionen zu untersuchen.

Der Austausch von Asp¹⁸⁹ gegen positiv geladene Reste wie Arginin, Lysin oder Histidin führte entgegen den Erwartungen nicht zu einer Spezifität für Asparaginsäure- oder Glutaminsäure-Reste entsprechender Trypsin-Varianten [GRAF et al.; 1987; WILLETT et al., 1995, PERONA & CRAIK, 1995]. Stattdessen zeigten diese Trypsin-Spezies in Analogie zu *Trp D189S* eine deutlich verminderte Gesamtaktivität mit Präferenz für Substrate mit aromatischer Aminosäureseitenkette in P₁-Position. Die Variante *Trp D189K* zeichnet sich darüber hinaus durch einen besonders dramatischen Aktivitätsverlust gegenüber Substraten mit P₁-Lysin und P₁-Arginin aus, wobei die Spezifitätskonstanten für Substrate mit Phenylalanin und Tyrosin in derselben Position im Bereich des Wildtyp-Enzyms lagen und folglich geringer sind als bei der Variante *Trp D189S* [GRAF et al. 1987]. Basierend auf Ergebnissen von Computer-unterstützten Bindungsstudien kam man zu der Annahme, daß die geringe Gesamtaktivität von *Trp D189K* das Ergebnis einer verzerrten Positionierung der zu spaltenden Bindung in Bezug auf das aktive Ser¹⁹⁵ sein könnte [BRIAND et al., 1999, GRAF et al., 1987]. Dagegen ist bislang unklar, ob die e-Aminogruppe des artifiziellen Lysinrestes überhaupt direkt mit potentiellen Substraten interagiert, da sie alternativ auch mit zwei benachbarten Carbonyl-Sauerstoffatomen im Inneren des Enzyms Wechselwirkungen eingehen könnte [GRAF et al., 1987]. Im letzteren Fall hätte die S₁-Bindungstasche einen überwiegend hydrophoben Charakter, was jedoch ebenfalls nicht im Widerspruch zum beobachteten Aktivitätsverlust gegenüber

Substraten mit P₁-Arginin bzw. -Lysin stehen würde. Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien mit der Variante *Trp D189H*. In diesem Fall scheint es jedoch gesichert, daß die Seitenkette von His¹⁸⁹ eine vom Substrat abgewandte Orientierung einnimmt [WILLET et al., 1995]. Zusätzlich zeigt die Kristallstruktur von *Trp D189H* Konformationsänderungen innerhalb zweier Oberflächenloops (Loop 1 und 2). Hydrolyseexperimente offenbarten weiterhin, daß diese Enzym-Variante keine detektierbare Aktivität gegenüber Amid-Substraten mit Asp, Glu bzw. Arg in P₁ Position besitzt [WILLET et al., 1995].

Auf Grund der durchweg deutlich verringerten proteolytischen Aktivität gegenüber ursprünglich spezifischen Lysin- und Arginin-enthaltenden Substraten stellen Trypsin-Varianten mit modifiziertem Asp¹⁸⁹ gute Ausgangspunkte im Hinblick auf die gegebene Zielstellung des Designs einer Peptidligase dar. Ein weiterer Vorteil könnte aus dem überwiegend hydrophoben Charakter der S₁-Bindungstasche dieser Spezies resultieren, der neben der Akzeptanz von klassischen Estersubstraten mit aromatischen Aminosäureresten in P₁-Position auch die spezifische Erkennung von Substratmimetika mit aromatischen Esterabgangsgruppen vermitteln könnte.

2.2.3.2. Trypsin-Varianten mit Elastase-ähnlicher S₁-Bindungsregion

Die ursprüngliche Annahme, daß die Bevorzugung kleiner ungeladener Aminosäurereste durch Elastase einzig und allein durch die Beschaffenheit der S₁-Bindungstasche bewirkt wird, gilt heute als überholt. Stattdessen wurden zusätzliche Strukturelemente außerhalb der primären Bindungstasche identifiziert, die ebenso an der korrekten Positionierung der zu spaltenden Bindung und damit an der Ausbildung der jeweiligen individuellen Spezifität beteiligt sind. So zeigen Strukturvergleiche zwischen den genannten Enzymen, daß die Rückgratkonformation des Aminosäurerestes in Position 216 in Abhängigkeit vom Enzym wesentlichen Änderungen unterliegt und folglich an der Ausprägung der Enzymspezifität beteiligt ist [PERONA et al., 1995]. In der Tat lassen sich anhand der Geometrie dieses Aminosäurerestes drei Gruppen von Enzymen einteilen, die mit der Spezifität in S₁-Position zusammenfallen und eine Unterscheidung in Trypsin-, Chymotrypsin- und Elastase-ähnliche Proteasen erlauben [PERONA et al., 1995]. Unterschiedlich ist zudem die Natur der jeweiligen Aminosäure in dieser Position. Während in Trypsin- wie auch Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen Glycin vorherrschend ist, weisen Elastase-ähnliche Enzyme in dieser Position häufig einen sterisch anspruchsvolleren

Valinrest auf. Ähnlich ist die Situation für die in Position 226 befindliche Aminosäure. Röntgenstrukturanalysen konnten zeigen, daß sperrige Aminosäureseitenketten in diesen Positionen partiell oder vollständig den Zugang für raumgreifende Substrate zur S₁-Bindungstasche bei Elastase-ähnlichen Enzymen blockieren [PERONA et al., 1995]. Zusätzlich bilden die beiden Aminosäurereste sowohl in pankreatischer als auch in humaner neutrophiler Elastase eine hydrophobe Plattform für den P₁-Aminosäurerest des Substrates. Zudem konnte Val²¹⁶ eine Funktion bei der Bindung der in P₃-Position befindlichen Aminosäure, vermittelt durch Wasserstoffbrückenbindungen, zugeordnet werden [NAVIA et al., 1989; WATSON et al., 1970]. Im Falle von Trypsin führt eine Alaninsubstitution von Gly²¹⁶ und Gly²²⁶, das bei diesem Enzym zudem in direktem Kontakt zu Asp¹⁸⁹ steht, zu einer Verringerung der Spezifität gegenüber typischen Trypsinsubstraten um bis zu 4 Größenordnungen. Interessanter Weise ist jedoch *Trp G216A* spezifischer für Arginin und *Trp G226A* spezifischer für Lysin als der Wildtyp [CRAIK et al., 1985]. Somit zieht ein Austausch sowohl eines als auch beider Glycine deutlich veränderte Substrateinbindungs- und Katalyseeigenschaften nach sich und erklärt wieso beide Aminosäurereste innerhalb der Trypsinfamilie der Serinproteasen hoch konserviert sind [CRAIK et al., 1985, WILKE et al., 1991, PERONA et al., 1994 und 1995; HUNG et al., 1998, RYPNIEWSKI et al., 1994]. Analog dem Beispiel der Umwandlung von Trypsin in Chymotrypsin wurde von HUNG & HEDSTROM (1998) versucht, Trypsin in eine Protease mit Elastase-ähnlicher Spezifität umzuwandeln. Dabei wurden unter anderem die genannten Aminosäurereste 216, 226 sowie 189 für gezielte Substitutionen einbezogen. Als Ergebnis dieser Studie wurde eine Trypsin-Variante erhalten, die bis zu 2,5% der Esteraseaktivität von nativer Elastase besaß. Hingegen wurde für dieses Enzym nur eine um mehr als 6 Größenordnungen verminderte Elastase-ähnliche Amidaseaktivität gefunden. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Aminosäurereste Asp¹⁸⁹, Gly²¹⁶ und Gly²²⁶ entscheidenden Einfluß auf die Amidaseaktivität des Trypsins besitzen. Aus diesem Grund wurden in eigenen Studien die genannten Aminosäuren gegen ihre Analoga in Elastase Ser¹⁸⁹, Val²¹⁶ und Thr²²⁶ ausgetauscht. Da Elastase keine größeren Aminosäureseitenketten in P₁-Position akzeptiert, stellte sich zunächst die Frage, ob die vom phenolischen Grundkörper abgeleiteten Esterabgangsgruppen typischer Substratmimetika überhaupt zu einer erfolgreichen Acylierung solcher Trypsin-Varianten führen. Erste Anhaltspunkte hierzu lieferten Studien aus unserem Arbeitskreis, in denen eine

Aktivität von nativer Elastase gegenüber dem Substrat Boc-Glu-OGp detektiert werden konnte [MÜLLER & BORDUSA, 2000].

2.2.3.3. Eliminierung der Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁹¹ und Cys²²⁰

Eine weitere Möglichkeit zur Verminderung der Amidaseaktivität von nativem Trypsin bietet die Deletion der Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁹¹ und Cys²²⁰ [WANG et al., 1997]. Diese Disulfidbrücke verbindet Loop 1 und Loop 2 der primären Substratbindungstasche, deren Funktion für die Substratdiskriminierung durch Trypsin und Chymotrypsin bereits unter 2.2.3. diskutiert wurde. Die Disulfidbrücke selbst ist in der Trypsinfamilie der Serinproteasen hoch konserviert, während das Segment umfassend die Aminosäurereste 217-224 in dem die Disulfidbrücke zu finden ist, zwischen 5 und 21 Aminosäuren enthalten kann [GREER, 1990]. Wie von WANG et al. (1997) gezeigt werden konnte, ist bei der Variante *Trp C191A/C220A* die Spezifität gegenüber Amidsubstraten mit Arginin und Lysin in P₁-Position um den Faktor 20 bis 200 herabgesetzt, während die Spezifität für die Hydrolyse analoger Estersubstrate nur 5 bis 10fach verringert ist. Die gleichermaßen sowohl für Oligopeptid- als auch einfache Aminosäure-Amidsubstrate beobachtete Spezifitätsverringeringung läßt vermuten, daß Wechselwirkungen in den entfernteren S₂- bis S₄-Bindungsregionen den Defekt in der S₁-Bindungstasche nicht kompensieren können. Kritisch zu beurteilen ist jedoch die im Vergleich zum Wildtyp-Trypsin höhere Amidaseaktivität gegenüber typischen Chymotrypsin-Substraten [VARALLYAY et al., 1997]. Allerdings können artifizielle Aminosäurereste in beiden Positionen durch direkte Wechselwirkung mit dem P₁-Aminosäurerest des Substrates, oder wie in Mast-Zell-Protease II über die S₃-Bindungsregion, die Spezifität und damit die Aktivität des Enzyms beeinflussen [REMINGTON et al., 1988]. Aus diesem Grund eröffnet die Deletion der Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁹¹ und Cys²²⁰ weitreichende Möglichkeiten zur Manipulation der Spezifität von Trypsin.

2.2.4. Modifizierung der S₁'-Bindungsregion

Nicht nur aus synthetischer sondern auch aus enzymologischer Sicht stellt die Delokalisierung der Enzymspezifität aus der S₁- in die S₁'-Bindungsregion der Protease einen sehr interessanten Ansatz zur Umgehung der nativen Primärspezifität dar. Dies könnte insbesondere dann von Bedeutung sein, wenn die

S₁-Bindungstasche, wie es möglicherweise für die Varianten mit Elastase-ähnlicher Struktur zutreffen könnte (vgl. Pkt. 2.2.3.2.), für größere Aminosäurereste bzw. Esterabgangsgruppen unzugänglich ist und somit eine Substratbindung in S₁-Position nur eingeschränkt erfolgen kann. In solchen Fällen wäre eine Vermittlung der Substratazeptanz durch eine alternative Einpassung der Esterabgangsgruppe des Substratmimetikums in der S₁'-Bindungsregion, bei entsprechender Manipulation dieser Bindungsstelle, denkbar. In Analogie hierzu könnte diese Strategie zur Optimierung Zymogen-ähnlicher Trypsin-Varianten von Nutzen sein, da wie unter Pkt. 2.2.2. aufgeführt die Primärspezifität von Trypsinogen nur wenig ausgeprägt ist. Die prinzipielle Möglichkeit der Modulation der Primärspezifität von Proteasen durch Mutationen im S'-Bindungsbereich ist bereits seit vielen Jahren bekannt [FERSHT, 1984].

Die Charakterisierung des S'-Bindungsortes wurde vor allem seit der Anwendung von Proteasen für die enzymatische Peptidsynthese vorangetrieben. Einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der S'-P'-Wechselwirkungen von Trypsin und Chymotrypsin lieferten Acyltransferexperimente auf Peptidbibliotheken [SCHELLENBERGER et al. 1994, ULLMANN & JAKUBKE 1994] sowie Untersuchungen der strukturellen Determinanten der S'-Spezifität von Trypsin [KURTH et al., 1997]. Demnach bevorzugt Trypsin in der S₁'-Position überwiegend große hydrophobe aliphatische bzw. aromatische Aminosäurereste, wobei die Spezifität für Methionin in dieser Position am höchsten ist. Ein Acyltransfer auf Prolin wird hingegen vermutlich aus sterischen Gründen durch beide Enzyme nicht katalysiert. In den Strukturen von Rattentrypsin im Komplex mit BPTI [PERONA et al. 1993] werden die sich zum Teil überlappenden S₁'- und die S₃'-Bindungsorte (vgl. Abb. 11) vor allem durch zwei Oberflächenloops umfassend die Aminosäurereste 58-64 (Loop 60) und 34-41 (Loop 40) gebildet. Die gefundene Präferenz für hydrophobe Aminosäurereste sowohl in P₁'- als auch P₃'-Position des Substrates erklärt sich demnach als Folge des einheitlich hydrophoben Charakters beider z.T. identischer Bindungsregionen. Kleine ungeladene, vor allem jedoch saure Aminosäuren werden hingegen in beiden Positionen nur relativ schlecht akzeptiert. Die Substitution von Lysin gegen Glutaminsäure in Position 60 innerhalb des Loops 60 im Trypsin führte zu einem bemerkenswerten Anstieg der Spezifität gegenüber P₁'-Aminosäureresten mit basischer Seitenkette um bis zu 2 Größenordnungen im Fall von P₁'-Argininsubstraten [KURTH et al., 1998]. Die signifikante Zunahme der S₁'-Spezifität

von *Trp K60E* für Arginin ist vermutlich auf eine Salzbrücke, die sich zwischen dem P_1' -Arginin und Glu^{60} ausbildet, zurückzuführen [GOODSELL et al., 1996; MORRIS et al., 1996]. Möglicherweise ist dieser artifizielle Glutaminsäurerest aber ebenso in der Lage, Wechselwirkungen zu einer Esterabgangsgruppe mit basischer Funktionalität, wie sie z.B. bei Substratmimetika vom OGp-Estertyp vorhanden ist, einzugehen und somit einen Beitrag zur Erhöhung der Spezifität gegenüber diesem Substratmimetikatyp zu leisten. Unter diesem Gesichtspunkt wurde der überwiegende Teil der Trypsin-Varianten mit der Substitution K60E kombiniert.

Bezüglich der Delokalisierung der Spezifität in den S_1' -Bindungsort einer Protease ist jedoch kritisch zu bedenken, daß Esterabgangsgruppen mit hoher Affinität zu dieser Bindungsstelle zumindest hypothetisch die Einpassung nukleophiler Aminokomponenten in kompetitiver Weise behindern könnten. Als Folge hiervon wäre mit verminderten Syntheseausbeuten zu rechnen. Es bleibt daher im Einzelfall zu prüfen, ob die Anpassung der S_1' -Spezifität an die Esterabgangsgruppe des Substratmimetikums zur Ausschaltung der Primärspezifität einer Protease bei Enzym- bzw. Zymogen-katalysierten Peptidbindungsknüpfungen vorteilhaft ist.

3. Ergebnisse und Diskussion

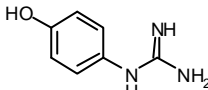
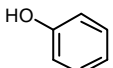
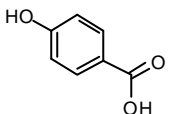
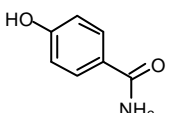
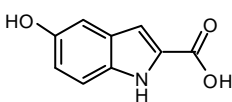
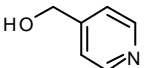
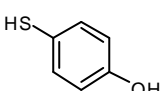
3.1. Testsysteme zur Charakterisierung von Trypsin-Varianten

3.1.1. Hydrolysestudien unter Verwendung verschiedener Substratmimetika

In initialen Experimenten galt es zunächst zu testen, ob die konstruierten Trypsin-Varianten Substratmimetika mit einer ausreichenden Effizienz hydrolysieren und somit einen effektiven Acyltransfer in einem angemessenen Zeitraum vermitteln können. Da anzunehmen ist, daß sich die eingeführten Modifizierungen auch auf die Spezifität der Protease auswirken, wurden Substratmimetika mit verschiedenen aromatischen Esterabgangsgruppen der allgemeinen Form Boc-Ala-OR/SR in Hydrolysestudien verwendet (s. Tab. 1). Dabei basierte die Auswahl der Strukturen auf dem Kenntnis, daß Trypsin-Varianten mit substituiertem Asp^{189} bzw. natives Trypsinogen hydrophobe Seitenketten in P_1 -Position bevorzugen [ANTONINI et al., 1984; ELSNER, 2000]. Weiterhin wurde auch auf Molecular Modeling-Studien zurückgegriffen, bei denen es sich gezeigt hat, daß die Guanidinophenylgruppe für

Varianten mit negativen Resten bzw. Serin in Position 189 der S_1 -Bindungsregion, wie bereits für Wildtyp-Trypsin und Chymotrypsin gezeigt [THORMANN et al., 1999; GÜNTHER et al., 2000], geeignet sein sollte. Die OPic-Abgangsgruppe ist kleiner als OGp aber ebenfalls partiell positiv geladen und könnte demzufolge in Zymogenen auf Grund der kleineren S_1 -Bindungstasche zu einer verbesserten Substrateinpassung führen. Umgekehrt könnte sich der negativ geladene OCp-Ester für Varianten bei denen Asp¹⁸⁹ gegen basische Aminosäuren ausgetauscht wurde als effizienter erweisen. Der OCap-Ester erlaubt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu verschiedenen Serinen, wie es z.B. auch für den Guanidinphenylester im Chymotrypsin visualisiert werden konnte und ist daher für Varianten mit Chymotrypsin-ähnlicher S_1 -Bindungsregion interessant.

Tab.1: Substratmimetika zur Ermittlung der Präferenz von Trypsin, Trypsinogen sowie abgeleiteter Varianten für bestimmte Abgangsgruppenstrukturen.

Substratmimetikum	Struktur der Abgangsgruppe	Name
Boc-Ala-OGp		Boc -Alanyl-4-Guanidinophenylester
Boc-Ala-OPh		Boc -Alanyl-Phenylester
Boc-Ala-OCp		Boc -Alanyl-4-Carboxyphenylester
Boc-Ala-OCap		Boc -Alanyl-4-Carboxamidophenylester
Boc-Ala-OInd		Boc -Alanyl-2-Carboxy-1H-Indol-5ylester
Boc-Ala-OPic		Boc -Alanyl-Picolylester
Boc-Ala-SPhOH		Boc -Alanyl-4-Hydroxyphenylthioester

Für den OInd-Ester, welcher ein reines Produkt Computer-basierter Berechnungen ist, wurde eine gute Substrateinbindung in Chymotrypsin vorhergesagt. Substratmimetika mit dieser Abgangsgruppe wären somit speziell für die Trypsin-Varianten mit ausgeprägter hydrophober Chymotrypsin-ähnlicher S_1 -Bindungstasche relevant. Der OPh-Ester ist als Vertreter des reinen Grundkörpers zu betrachten. Im Vergleich aller Abgangsgruppen lassen sich hier Rückschlüsse ziehen, welchen Beitrag die einzelnen Substitutionen am Aromaten zur Gesamtspezifität leisten. Der SPhOH-Ester läßt Rückschlüsse auf die Bedeutung des Aktivierungsgrades des Mimetikums zu, wobei außerdem die OH-Gruppe analog einer Tyrosin-Seitenkette für Wechselwirkungen mit dem Enzym zur Verfügung steht.

In Hydrolyseexperimenten wurde für jede konstruierte Trypsin-Variante unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgelisteten Ester das Substratmimetikum ermittelt, das durch den jeweiligen Katalysator am schnellsten hydrolysiert wurde. Die gewonnenen Daten sind an entsprechender Stelle in Form von initialen Hydrolysegeschwindigkeiten (X/min^{-1}) unter Berücksichtigung der verwendeten Enzymkonzentrationen dargestellt. Die Abbildung 9 zeigt die für *wt Trypsin* auf diese Weise ermittelten Ergebnisse, die im Zusammenhang mit nachfolgenden experimentellen Daten dieser Arbeit als Referenz dienen. Daraus geht eine signifikante Diskriminierung zwischen den verwendeten Abgangsgruppen hervor. Entsprechend der bekannten nativen Spezifität wird von *wt Trypsin* das Mimetikum mit der basischen Guanidinophenyl-Abgangsgruppe um bis zu 3 Größenordnungen schneller hydrolysiert als die anderen Substrate. Ausschlaggebend hierfür sind die Wechselwirkungen zwischen der basischen Guanidinofunktion und der sauren Asparaginsäureseitenkette des Restes 189 am Grund der S_1 -Bindungstasche. Weiterhin ist aus Abbildung 9 abzulesen, daß offenbar auch die OCap-Abgangsgruppe moderat spezifische Wechselwirkungen mit der primären Bindungsregion des nativen Katalysators eingehen kann, da der entsprechende Ester fast 1 Größenordnung schneller hydrolysiert wird als andere Substratmimetika, ausgenommen OGp. Das am wenigsten effiziente Substrat stellt auf Grund einer lediglich marginalen Hydrolyserate der Boc-Ala-OInd-Ester dar. Zum einen kann die geringe Hydrolysegeschwindigkeit auf der Gleichartigkeit der Ladung von der Asp¹⁸⁹ Seitenkette und der Esterabgangsgruppe beruhen. Andererseits gibt die Asp-Seitenkette in Position 189 möglicherweise nicht genügend Raum für die Einbindung einer größeren Abgangsgruppe wie OInd in die S_1 -Bindungstasche frei.

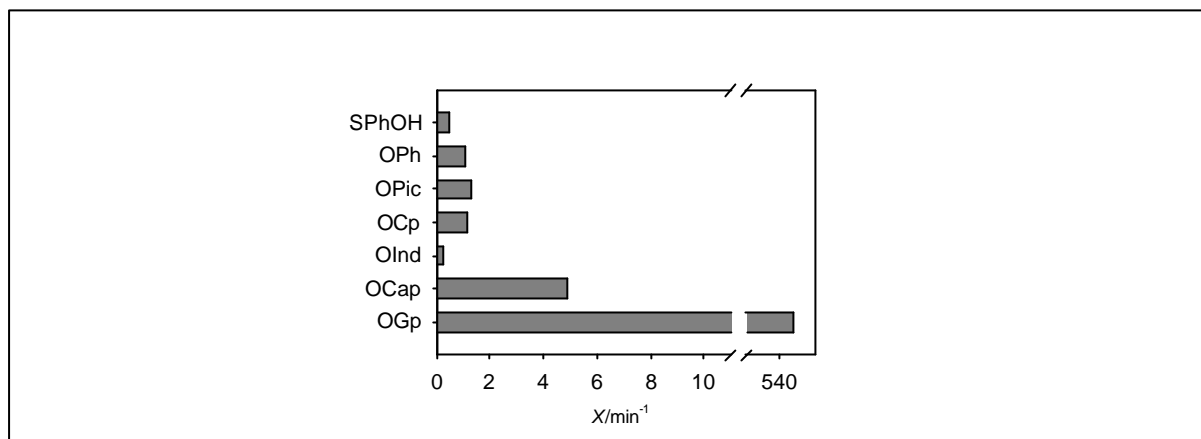


Abb. 9: Initiale Geschwindigkeiten X/min^{-1} der Hydrolyse ausgewählter Substratmimetika des Typs Boc-Ala-OR/SR katalysiert durch *wt Trypsin*.

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , 30 °C, 8% DMF, [Boc-Ala-OR/SR]: 2 mM, [*wt Trypsin*]: $1,2 \times 10^{-6}$ M - $1,5 \times 10^{-5}$ M

3.1.2. Beurteilung der Amidaseaktivität mittels ausgewählter Modellreaktionen

Um das Risiko unerwünschter proteolytischer Spaltung durch die Trypsin-Varianten in späteren Synthesereaktionen abschätzen zu können, wurden Acyltransferreaktionen unter Verwendung des Mimetikums mit der im ersten Schritt ermittelten schnellsten Hydrolyserate durchgeführt. Dabei wurde die Boc-Schutzgruppe der Estersubstrate durch eine Benzoyl-Schutzgruppe aus Gründen einer sensitiveren Analytik des Reaktionsverlaufes ersetzt. Die für die Modellreaktionen verwendeten Acylakzeptoren entsprachen der allgemeinen Form H-Ala-Ala-*Xaa*-Ala-Gly-OH mit *Xaa* = Arg/Lys/Phe/Tyr. Dabei stellen die zentralen basischen bzw. aromatischen Aminosäuren mögliche Spezifitätszentren der konstruierten Trypsin-Varianten dar, so daß eine Spaltung der synthetisierten Produkte auf eine entsprechende Amidaseaktivität des Katalysators hinweist. Mittels HPLC-Analytik wurden Reaktionsverläufe im Zeitraum von 4 bzw. 6 Stunden (Trypsinogen-ähnliche Varianten) aufgenommen und ausgewertet. Durch Ermittlung der Peakflächenintegrale entsprechender Chromatogramme erfolgte die Berechnung des prozentualen Anteils an intaktem Peptidprodukt sowie die Berechnung der Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt (die Angabe der Summe erfolgt in den Tabellen in Klammern nach der Produktausbeute). Zur Beurteilung der Amidaseaktivität wurden die initialen Geschwindigkeiten der Hydrolyse des Esters und des synthetisierten Peptidproduktes innerhalb eines

Reaktionsansatzes berechnet und das Verhältnis zueinander bestimmt, woraus der Quotient $V_{iEster}/V_{iProdukt}$ resultiert. Je größer der Quotient aus den initialen Hydrolysegeschwindigkeiten von Ester und Peptidprodukt, desto geringer ist die relative Amidaseaktivität und damit verbunden die Gefahr unerwünschter proteolytischer Spaltungen während der Synthesereaktion. Die Tabelle 2 zeigt die nach beschriebener Vorgehensweise ermittelten Daten für *wt Trypsin*, wobei entsprechend den Ergebnissen der Esterhydrolyse als Acyldonor Bz-Gly-OGp für die Modellreaktionen verwendet wurde.

Auf Grund der ausgeprägten Spezifität von Trypsin für Substrate mit basischen Aminosäuren liegen die Ausbeuten an intaktem Peptidprodukt für Bz-GAARAG lediglich bei 23,5% und bei 41,4% für Bz-GAAKAG. Dabei deutet die hohe Differenz zwischen der Summe aus intaktem und gespaltenem Produkt (39,7% für Bz-GAAKAG/Bz-GAAK und 61,9% für Bz-GAARAG/Bz-GAAR) bereits auf eine signifikante Proteolyse hin. Die erwartete höhere Stabilität des Produktes mit zentralem Lysin spiegelt sich im Verhältnis von Ester- und Amidhydrolyse mit einem Wert von 3,2 wider. Demgegenüber ist die Spezifität von Wildtyp-Trypsin für Bz-Gly-OGp und Bz-GAARAG mit einem Esterase-/Amidaseverhältnis von 1,3 fast identisch, was letztendlich zu der geringen Ausbeute im Vergleich zu allen anderen Reaktion führt.

Tab. 2: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-OGp auf Pentapeptide mit zum Teil sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *wt Trypsin*.

Acyldonor	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
Bz-Gly-OGp	AAKAG	41,4 (81,1)	3,2
	AARAG	23,5 (85,4)	1,3
	AAFAG	82,2 (82,2)	k.S.
	AA YAG	81,9 (81,9)	k.S.

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*wt Trypsin*]: $7,5 \times 10^{-7}$ M

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acyldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes, k.S.: keine Spaltung; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

Auf Grund der von *wt Trypsin* praktisch nicht akzeptierten aromatischen Seitenketten von Tyrosin und Phenylalanin wurde für die Peptidprodukte Bz-GAAYAG bzw. Bz-AAFAG keine Proteolyse detektiert.

Auf Grund der Vielzahl an zu testenden Trypsin-Varianten stellt die aufgezeigte Vorgehensweise mit einer Hydrolysestudie von verschiedenen Substratmimetika und nachfolgendem Acyltransfer auf Pentapeptide mit möglichen sensitiven Spaltstellen eine einfache und schnelle Art zur ersten Charakterisierung der konstruierten Trypsin- bzw. Trypsinogen-Varianten dar. Es sei der Vollständigkeit wegen an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß Trypsin-Varianten welche keine der in Tab. 1 aufgelisteten Ester signifikant umsetzten, nicht für einen nachfolgenden Acyltransfer auf Pentapeptide herangezogen wurden.

3.2. Untersuchungen zum Substratmimetika-vermittelten Acyltransfer katalysiert durch Trypsin- bzw. Trypsinogen-Varianten

3.2.1. Trypsin-Varianten mit Modifizierung von Ser¹⁹⁵ und His⁵⁷ der katalytischen Triade

Trp S195C, Trp H57A

In eigenen Vorversuchen zeigte sich, daß die Hydrolyse von klassischen Estersubstraten wie Bz-Arg-OEt durch *Trp S195C* signifikant langsamer katalysiert wird als unter Verwendung der nativen Protease. Dieser Befund steht im Einklang mit literaturbekannten Daten der Varianten *Trp S195C* und *Trp D102N/S195C*, die zwar eine verminderte Aktivität gegenüber Standardsubstraten zeigten, jedoch keine signifikanten strukturellen Unterschiede im Vergleich zum *wt Trypsin* aufwiesen [Mc GRATH et al., 1989; HIGAKI et al., 1989]. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob die vorgenommene Substitution von Serin gegen Cystein unter Verwendung von Substratmimetika zu einer verbesserten katalytischen Effizienz der Protease im Vergleich zu Standardsubstraten führt. Prinzipiell ist nicht zwangsläufig mit einer ähnlich verminderten Hydrolysegeschwindigkeit von Substratmimetika zu rechnen, da wie in Abschnitt 2.1.2. beschrieben die Substratbindung nach einem anderen Mechanismus als die kommerzieller Ester abläuft. Von den verwendeten Substratmimetika wurde lediglich der OGP-Ester detektierbar hydrolysiert. Nachfolgende Synthesereaktionen führten jedoch unter Verwendung der

Pentapeptide AAKAG und AARAG (s. Abb. 10) zu dem Ergebnis, daß die Variante *Trp S195C* unter den gewählten Bedingungen innerhalb von 4 Stunden keine effiziente Synthese katalysiert, da der Acyldonorester nicht vollständig vom Katalysator umgesetzt wurde. Erklärt werden könnte dieser Aktivitätsverlust durch ein mögliches strukturelles Problem bei der Positionierung des Schwefelatoms von Cys^{195} , welches das für die Katalyse essentielle Oxyanionloch blockieren könnte [Mc GRATH et al., 1989]. Weitere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß die strukturellen Unterschiede im katalytischen Apparat sowie den elektrostatischen Verhältnissen im aktiven Zentrum von Serin und Cystein Proteasen zwar gering sind, dennoch zur geringen Aktivität von *Trp S195C* führen könnten [Mc GRATH et al., 1989, HIGAKI et al., 1989, BEVERIDGE, 1996].

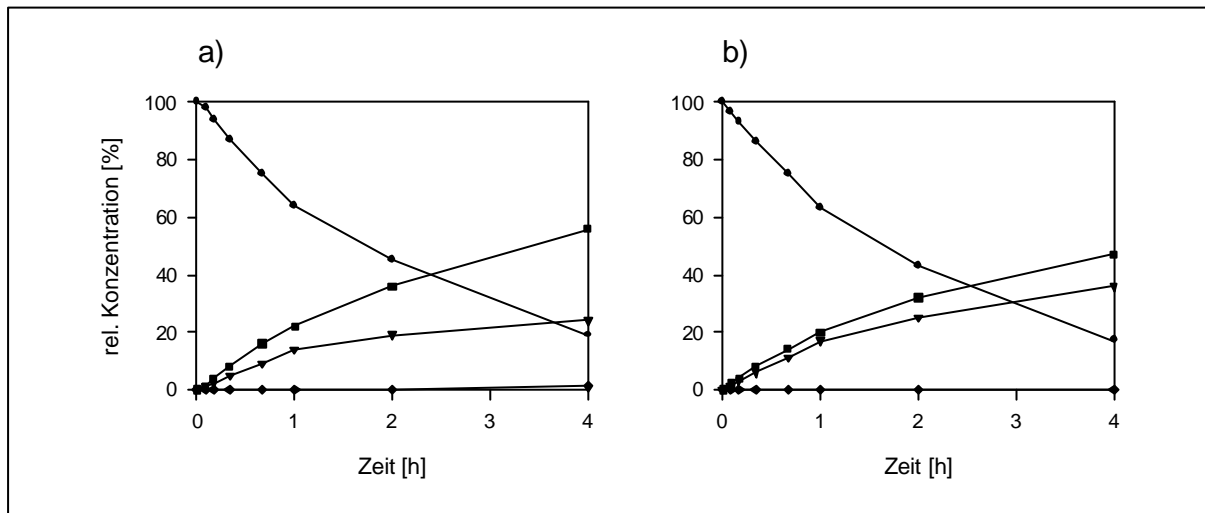


Abb. 10: Acyltransfer von Bz-Gly-OGp auf a) AARAG und b) AAKAG katalysiert durch *Trp S195C*. -□- Bz-Gly-OGp, -○- Bz-Gly-OH, -△- Bz-GAAR/KAG, -◆- Bz-GAAR/K
Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp S195C*]: $8,0 \times 10^{-5}$ M

Der positive Effekt auf die Aminolysereaktion durch den Austausch von S195C ist zwar im Fall von Subtilisin für kommerzielle Substrate bewiesen, konnte jedoch nicht auf Trypsin unter Einbeziehung des Substratmimetika-Konzeptes übertragen werden.

Ebenso wie *Trp S195C* zeigte auch die Variante *Trp H57A* eine sehr geringe katalytische Aktivität gegenüber den ausgewählten Substratmimetika. Dieses Ergebnis korreliert mit Daten der Literatur unter Verwendung von Standardsubstraten [COREY & CRAIK, 1992, COREY et al., 1995, CARTER & WELLS, 1987, CARTER &

WELLS, 1988], wobei die K_M -Werte für getestete Amid-Substrate nahezu unbeeinflusst von der Mutation blieben, sich die k_{cat} -Werte jedoch um bis zu 5 Größenordnungen verringerten. Auf Grund der nur marginalen Hydrolyseraten von Substratmimetika bedingt durch die Mutation H57A wurden keine Acyltransferexperimente durchgeführt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Modifizierungen im Bereich der katalytischen Triade von Trypsin nicht geeignet waren, um das synthetische Potential des Katalysators zu erhöhen. Ausschlaggebend hierfür ist die praktisch unzureichende Aktivität der konstruierten Trypsin-Varianten gegenüber ausgewählten Substratmimetika.

3.2.2. Trypsin D189S und abgeleitete Varianten

Die Ergebnisse der Variante *Trp D189S* werden an dieser Stelle gesondert vorgestellt, da der Austausch D189S eine grundlegende Modifizierung mehrerer getesteter Varianten ist und somit im weiteren Verlauf der Arbeit als Referenz dient. Die Auswirkung jeder zusätzlichen Modifizierung innerhalb der Protease wird in nachfolgenden Kapiteln in Zusammenhang mit der Ausgangsvariante *Trp D189S* diskutiert. Mit der Variante *Trp D189S/K60E* wurde weiterhin erstmalig der Einfluß der zusätzlichen Modifizierung K60E im S_1' -Bindungsbereich der Protease auf die Aktivität des Katalysators aufgezeigt.

Aus den Daten der Esterhydrolyse (vgl. Abb. 11) geht hervor, daß *Trp D189S* kaum zwischen den verschiedenen aromatischen Abgangsgruppen der Mimetika diskriminiert. Somit tragen die Substituenten des Aromatenringes nur unwesentlich zur Gesamtspezifität der Abgangsgruppen bei. Die geringe Bevorzugung des Guanidinophylesters könnte, wie auch für Chymotrypsin beobachtet wurde, auf Interaktionen der Guanidinofunktion der Abgangsgruppe mit Ser¹⁸⁹ zurückzuführen sein, wobei sich die Hydrolysegeschwindigkeit für Boc-Ala-OGp um mehr als zwei Größenordnungen verglichen mit nativem Trypsin verringert hat. Ebenfalls reduziert, um etwa die Hälfte verglichen mit dem Wildtyp, ist die Hydrolyserate des Boc-Ala-OCap Esters, was die Vermutung nahe legt, daß die *p*-Carboxamidofunktion nicht nur mit Serin sondern offenbar auch mit negativ geladenen Resten wie Asp¹⁸⁹ moderate Wechselwirkungen ausbilden kann.

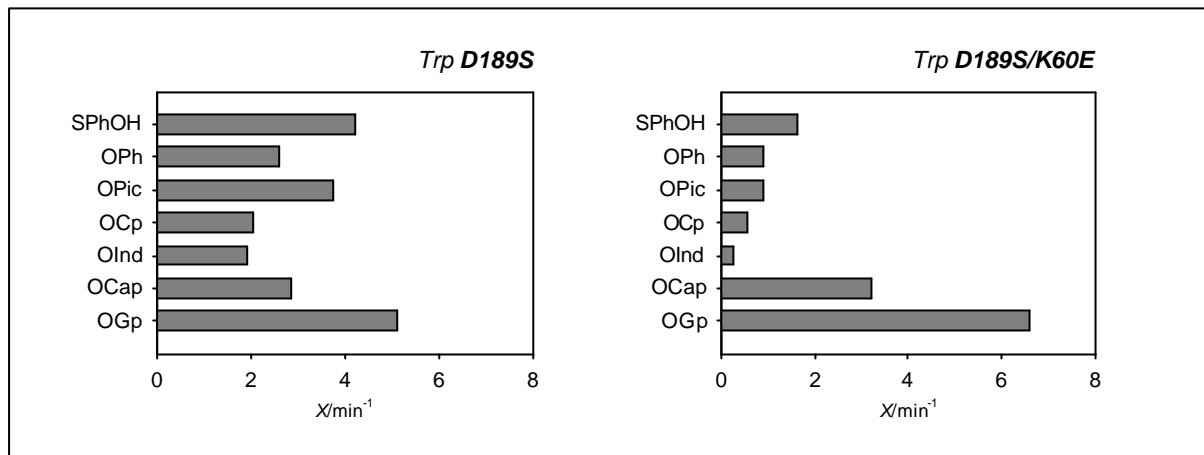


Abb. 11: Initiale Geschwindigkeiten X/min^{-1} der Hydrolyse ausgewählter Substratmimetika des Typs Boc-Ala-OR/SR katalysiert durch *Trp D189S* bzw. *Trp D189S/K60E*.

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0); 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , 30 °C, 8 % DMF, [Boc-Ala-OR/SR]: 2 mM, [*Trp D189S*]: $1,5 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D189S/K60E*]: $1,5 \times 10^{-5}$ M

Erhöht hat sich dagegen die Hydrolysegeschwindigkeit der Ester mit der SPhOH- (ca. 8fach) und der OInd-Abgangsgruppe (ca. 6fach). Für letztere war durch computerbasierte Studien eine erhöhte Akzeptanz für Chymotrypsin vorhergesagt, so daß dieses Ergebnis auf Grund der Chymotrypsin-ähnlichen S_1 -Bindungstasche von *Trp D189S* nicht überraschte. Wahrscheinlich gibt die Serin-Seitenkette in Position 189 mehr Raum für die Einbindung einer größeren Abgangsgruppe frei als der normalerweise in Trypsin an dieser Stelle vorhandene Asparaginsäurerest. Andererseits kann die erhöhte Hydrolyserate des OInd-Esters im Vergleich zum Wildtyp auch auf dem Fehlen der negativen Ladung der Asp¹⁸⁹ Seitenkette beruhen. Ausschlaggebend für die beschleunigte Hydrolyse des Thioesters sollte einerseits ebenfalls die durch den Austausch D189S bedingte Chymotrypsin-ähnliche S_1 -Bindungstasche des Katalysators sein, die eine Präferenz für aromatische Aminosäureseitenketten (insbesondere Tyrosin) bedingt. Zusätzlich könnte sich die strukturelle Ähnlichkeit der SPhOH-Abgangsgruppe zur Tyrosinseitenkette bei der Erkennung und Einbindung des Substrates als Vorteil erweisen. Die Substitution D189S führt verglichen mit nativem Trypsin weiterhin zu einer unerwartet beschleunigten Hydrolyse des Mimetikums mit der OPic-Abgangsgruppe (ca. 2,5 fach). Die Kombinationsvariante *Trp D189S/K60E* diskriminiert zwischen den verschiedenen Abgangsgruppen stärker als *Trp D189S* (vgl. Abb. 11). Der

Glutaminsäurerest in Position 60 führt in diesem Katalysator zu einer, wenngleich auch geringen, Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit des OGP-Mimetikums. Der OCap-Ester wird von beiden Trypsin-Varianten gleichermaßen akzeptiert. Alle anderen Mimetika hingegen zeigen eine Verminderung der Hydrolyserate verglichen mit *Trp D189S*. Damit ergibt sich erstmalig ein Anhaltspunkt dafür, daß Modifizierungen in der S₁'-Bindungsregion von Trypsin Auswirkungen auf die Akzeptanz von Substratmimetika mit verschiedenen Esterabgangsgruppen haben können.

Für die nachfolgende Untersuchung der Amidaseaktivität erfolgten Acyltransferreaktionen unter Verwendung von Bz-Gly-OGp (s. Tab. 3). Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt die Variante *Trp D189S* eine signifikant verminderte Spaltaktivität gegenüber den Produkten Bz-GAARAG und Bz-GAAKAG, wodurch die Ausbeuten der Synthesereaktionen mit 83,0% bzw. 83,8% nahe der Summe aus intaktem Produkt und gespaltenem Produkt (91,4% bzw. 89,4%) liegt. Während beim nativen Katalysator Synthese und Proteolyse des Peptidproduktes praktisch gleichzeitig und mit ähnlicher Intensität ablaufen, beginnt unter Verwendung von *Trp D189S* die proteolytische Spaltung der Produkte mit zentralem Arginin bzw. Lysin nachdem der Acyldonorester zu über 70% verbraucht ist. Dementsprechend steigt der Quotient aus $V_{\text{Ester}}/V_{\text{Produkt}}$ im Vergleich zum Wildtyp für Lysin ca. um den Faktor 6 auf 20,5 und für Arginin um ca. eine Größenordnung auf 15. Weniger stabil ist in der *Trp D189S*-katalysierten Reaktion das Syntheseprodukt mit zentralem Tyrosin. Während unter Verwendung des Acylakzeptors AAFAG eine Ausbeute von 68,2% erzielt werden konnte, beläuft sich der Anteil an intaktem Peptidprodukt unter Verwendung des Nukleophils AAYAG lediglich auf 44,7%, wobei der Quotient aus Ester- und Amidhydrolyse mit 5,6 signifikant niedriger ausfällt als für die Peptide mit zentralem Arginin, Lysin bzw. Phenylalanin. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten der Literatur, die bereits eine erhöhte Spezifität der Variante *Trp D189S* gegenüber Standardsubstraten mit aromatischen Resten, insbesondere Tyrosin, in P₁-Position des Substrates im Vergleich zu nativem Trypsin beschreiben [HEDSTROM et al., 1992]. Die Spaltung nach Tyrosin sollte ausschlaggebend für die limitierte Anwendbarkeit dieser Variante im Rahmen der Substratmimetika-vermittelten Peptidsynthese sein. In weiterführenden Studien von GRÜNBERG et al. wurde nach der Ursache für die erhöhte Aktivität von *Trp D189S* gegenüber Tyrosin gesucht, um über die Eliminierung möglicher Wechselwirkungspartner innerhalb der S₁-Tasche.

Tab. 3: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-OGp auf Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *Trp D189S* bzw. *Trp D189S/K60E*.

Acyldonor/Enzym	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
<i>Trp D189S</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	83,8 (89,4)	20,5
	AARAG	83,0 (91,4)	15,0
	AAFAG	68,2 (78,2)	22,7
	AA YAG	44,7 (91,6)	5,6
<i>Trp D189S/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	91,7 (93,0)	53,3
	AARAG	93,5 (94,2)	78,0
	AAFAG	91,8 (91,9)	78,0
	AA YAG	83,3 (92,6)	20,0

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D189S*]: $6,0 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189S/K60E*]: $3,0 \times 10^{-6}$ M;

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acyldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes, k.S.: keine Spaltung; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

Die Kristallstruktur von *Trp D189S* zeigt im Vergleich zum nativen Katalysator eine weitgehend unveränderte S₁-Bindungsregion [PERONA et al.; 1994]. Die Spezifität der Variante für Tyrosin könnte somit in Wechselwirkungen von Ser¹⁸⁹ mit dem Substrat begründet sein, wie in früheren Studien im Fall von Chymotrypsin vorgeschlagen [PERONA & CRAIK, 1995]. Deshalb wurde in nachfolgenden Untersuchungen Ser¹⁸⁹ gegen Alanin ausgetauscht und die Variante *Trp D189A* hergestellt. Da Ser¹⁹⁰ ebenfalls zur Spezifität von Trypsin beiträgt [SICHLER et al., 2002], wurden *Trp D189S/S190A* sowie *Trp D189A/S190A* in die Untersuchungen einbezogen. Die erhaltenen Ergebnisse belegen, daß alle drei Varianten eine verminderte Amidaseaktivität gegenüber Tyr-Xaa-Bindungen im Vergleich zu *Trp D189S* zeigen [GRÜNBERG et al., 2000]. Da jedoch die Syntheseprodukte Bz-GAARAG und Bz-GAAKAG in Gegenwart von *Trp D189A*, *Trp D189S/S190A* bzw. *Trp D189A/S190A*

nur unzureichende Stabilität zeigten, reicht es offensichtlich nicht aus, den negativen Rest Asp¹⁸⁹ in Kombination mit Ser¹⁹⁰ aus der Substratbindungstasche des Trypsin zu entfernen, um die Amidaseaktivität der Protease generell effizient auszuschalten.

Die zusätzliche Modifizierung in der Variante *Trp D189S/K60E* führte ausnahmslos zu einer Ausbeutesteigerung an intaktem Syntheseprodukt (10%-40%), was insbesondere für Bz-GAA₂YAG signifikant in Erscheinung tritt. Erklärt werden könnte dieser Befund mit einer durch Glu⁶⁰ bedingten verbesserten Einpassung der verwendeten Acylakzeptoren in die S'-Bindungsregion des Katalysators. Ein ähnlicher Befund wurde bereits von KURTH (1998) unter Einbeziehung von Docking-Studien für die Variante *Trp K60E* diskutiert. Es zeigte sich hierbei, daß Glu⁶⁰ umfangreichere Wechselwirkungen mit der P'-Region des Substrates eingehen kann als der normalerweise in dieser Position befindliche Lysinrest. Analog wurde für alle *Trp D189S/K60E*-katalysierten Synthesereaktionen ein erhöhter Quotient aus Esterhydrolyse und Amidhydrolyse ermittelt. Die dem zu Folge höhere Stabilität der Syntheseprodukte wäre in Ableitung der Ergebnisse der Hydrolysestudien (s. Abb. 11) jedoch nicht auf eine alleinige bessere Akzeptanz des Mimetikums im Vergleich zu *Trp D189S* zurückzuführen, da die Peptidprodukte unter Verwendung von *Trp D189S/K60E* um mehr als den Faktor 2 stabiler sind. Somit stellt die verbesserte Stabilität der Syntheseprodukte die Summe aus erhöhter Esteraseaktivität und verminderter Amidaseaktivität des Katalysators dar.

Bereits in literaturbekannten Studien wurde ein Einfluß durch die Substitution bzw. das Einführen von geladenen Aminosäurereste in das katalytische Zentrum auf die Aktivität und Spezifität von Enzymen beschrieben [DAVIS et al., 1999a, 1999b, DE KREIJ et al., 2002]. Die hierbei beobachtete verminderte proteolytische Aktivität der Katalysatoren deckt sich mit der in eigenen Studien diskutierten verminderten Amidaseaktivität von *Trp D189S/K60E*. Somit ist diese Trypsin-Variante im Rahmen der Mimetika-vermittelten Peptidsynthese besser geeignet als *Trp D189S*, wobei jedoch die proteolytische Aktivität gegenüber Tyr-Xaa-Bindungen eine Limitation für die Durchführung von Synthesereaktionen darstellen kann.

3.2.3. Zymogene und Zymogen-ähnliche Trypsin-Varianten

3.2.3.1. Zymogene

Tgn K15A, Tgn K15A/K60E, Tgn K15A/D194G, Tgn K15A/D194G/K60E

Bedingt durch das Vorhandensein der *N*-terminalen Prosequenz (FPVDDDDA) wurden die Varianten mit der Substitution K15A den Zymogenen zugeordnet. Während im Fall von *Tgn K15A* und *Tgn K15A/K60E* die Salzbrücke zwischen Asp¹⁹⁴ und His⁴⁰ intakt ist und somit eine Zymogen-Konformation angenommen wird, sollte *Tgn K15A/D194G* sowie *Tgn K15A/D194G/K60E* analog literaturbekanntem Trypsinogen-Varianten [PASTERNAK et al., 1998] auf Grund einer höheren Flexibilität im Bereich um Gly¹⁹³ lediglich eine Trypsinogen-ähnliche Konformation aufweisen. Trotz einer festgestellten Präferenz von Trypsinogen für aromatische Seitenketten in P₁-Position [ANTONINI et al., 1984; ELSNER, 2000] waren die vier getesteten Zymogen-Varianten nicht in der Lage, die verwendeten Substratmimetika effizient zu hydrolysieren. Dies steht im Fall des Mimetikums mit der Guanidinophenylfunktion in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ELSNER, wonach ein OGp-Ester nur mit vorangehendem Phenylalanin produktiv im aktiven Zentrum eingebunden wird [ELSNER, 2000]. Obgleich durch den Austausch von K60E eine zusätzliche saure Seitenkette in der S₁'-Bindungsregion für Wechselwirkungen mit basischen Abgangsgruppen wie OGp zur Verfügung steht, gelang eine Delokalisierung der Spezifität in die S₁'-Bindungsregion entsprechender Zymogen-Varianten nicht. Auch die Destabilisierung der Trypsinogen-Konformation durch den Austausch von D194G führte nicht zu einer erhöhten Aktivität gegenüber den Boc-Ala-OR/SR Estersubstraten. Basierend auf den bereits diskutierten Literatur-Befunden kann vermutet werden, daß in allen getesteten Varianten das nicht optimal ausgebildete Oxyanionloch neben der nicht optimalen Substrateinbindung in entscheidendem Maß zur katalytischen Ineffizienz entsprechender Katalysatoren beiträgt.

3.2.3.2. Trypsin-Varianten mit partieller Zymogenkonformation

Trp D194N, Trp D194N/D189S, Trp D194N/K60E, Trp D194N/D189SK60E

Auf Grund der Inaktivität der Zymogen-Varianten gegenüber den verwendeten Substratmimetika wurden im nächsten Schritt Trypsine mit partieller Zymogen-Konformation hergestellt. Ein zentrales Element aller in diesem Abschnitt

untersuchten Varianten ist der Austausch von Asp¹⁹⁴, der wie bereits beschrieben zur Eliminierung der Salzbrücke zum *N*-terminalen Ile¹⁶ führt und somit die Ausbildung einer Zymogen-ähnlichen Konformation der Trypsin-Varianten unterstützt. Aus eigenen früheren Acyltransferexperimenten unter Verwendung von Bz-Arg-OEt und H-Met-NH₂ war bekannt, daß durch *Trp D194N* eine sekundärhydrolytische Spaltung nach Arginin und in geringerem Umfang auch nach Lysin, nicht aber nach aromatischen Aminosäureresten erfolgt. Da prinzipiell auch unter Verwendung von Substratmimetika mit dieser proteolytischen Aktivität gegenüber Arginin enthaltenden Substraten zu rechnen war, wurde versucht, diese durch Asp¹⁸⁹ hervorgerufene Spaltung durch die Zusatzmutation D189S zu umgehen. Die Variante *Trp D189S* wurde bereits im Abschnitt 3.2.2. in Acyltransferstudien unter Verwendung von Substratmimetika charakterisiert und zeigte vorzugsweise eine prolytische Spaltung nach Tyrosin. Dies legte die Vermutung nahe, daß die Kombination beider Mutationen in *Trp D194N/D189S* möglicherweise zu einer Variante führt, die weder nach basischen noch nach aromatischen Resten spaltet, so daß *Trp D194N/D189S* in die Untersuchungen einbezogen wurde. Weiterhin galt es den Einfluß des Austausches von K60E in Kombination mit D194N bzw. D194N/D189S zu charakterisieren.

Die Variante *Trp D194N* zeigte im Ergebnis der Esterhydrolysen eine deutliche Präferenz für das Substratmimetikum mit der Guanidinophenylfunktion (s. Abb. 12). Dies überraschte nicht, da das intakte Aspartat 189 am Grund der Substratbindungstasche analog zum nativen Trypsin Wechselwirkungen mit der basischen Funktionalität der OGp-Abgangsgruppe eingehen kann. Zum anderen zieht eine durch die Mutation bedingte Destabilisierung der Aktivierungsdomänen, welche das Oxyanionloch und die S₁-Bindungstasche einschließen, den bereits vorausgesagten Aktivitätsverlust verglichen mit *wt Trypsin* nach sich. Vermutlich als Folge dieser Destabilisierung liegt die Hydrolysegeschwindigkeit von Boc-Ala-OGp für *Trp D194N* um den Faktor 60 verglichen zum nativen Katalysator niedriger (vgl. Abb. 9).

Der Austausch D189S in *Trp D194N/D189S* führte zu einer weniger aktiven Variante, die kaum zwischen den verschiedenen Esterabgangsgruppen diskriminiert. Dabei ist bedingt durch die Eliminierung der negativen Ladung des Asp¹⁸⁹ die Aktivität gegenüber dem OGp-Ester verglichen mit *Trp D194N* um den Faktor 20 herabgesetzt.

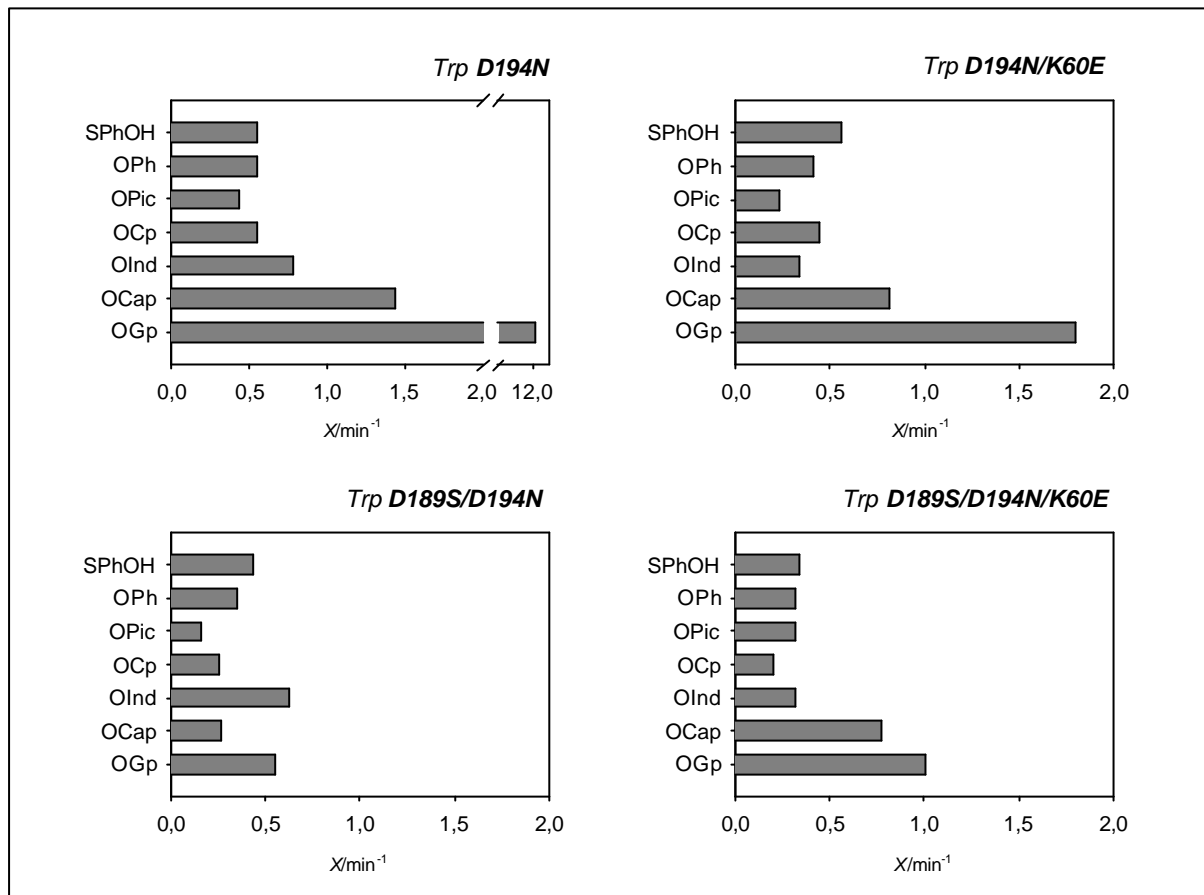


Abb. 12: Initiale Geschwindigkeiten X/min^{-1} der Hydrolyse ausgewählter Substratmimetika des Typs Boc-Ala-OR/SR katalysiert durch *Trp D194N*, *Trp D194N/K60E*, *Trp D194N/D189S* bzw. *Trp D194N/D189S/K60E*.

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , 30 °C, 8% DMF, [Boc-Ala-OR/SR]: 2 mM; [*Trp D194N*]: $1,2 \times 10^{-6}$ M; [*Trp D194N/K60E*]: $1,5 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D194N/D189S*]: $1,5 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D194N/D189S/K60E*]: $1,5 \times 10^{-5}$ M

Verglichen mit *Trp D189S* sinkt die Hydrolysegeschwindigkeit von Boc-Ala-OGp um den Faktor 10 und gegenüber der nativen Protease um den Faktor 1600.

Die zusätzliche Substitution von Lys⁶⁰ gegen Glu in *Trp D194N/D189S/K60E* bedingte eine um den Faktor 2 beschleunigte Hydrolyse des Boc-Ala-OGp Esters. Interessanter Weise bewirkt derselbe Austausch in *Trp D194N/K60E* eine Abnahme der Hydrolysegeschwindigkeit des OGp-Mimetikums (ca. Faktor 10) verglichen mit *Trp D194N*. Unter der Annahme, daß die Einbindung des Bz-Gly-OGp Esters über die S₁'-Bindungsregion (s. Abb. 6) erfolgt und der Tatsache, daß der Rest Glu⁶⁰ eine sehr oberflächenexponierte Position innerhalb des Katalysators einnimmt, wäre auf Grund der gegensätzlichen Ladung von Glu⁶⁰ und der Guanidinfunktion ein positiver

Effekt auf die Substratbindung durch die vorgenommene Substitution möglich. Auf der anderen Seite könnte Glu⁶⁰ in *Trp D194N/K60E* in Konkurrenz zum Asp¹⁸⁹ treten, wodurch eine Behinderung bei der Substratbindung in S₁ denkbar wäre und letztendlich zu der beobachteten Abnahme der Hydrolysegeschwindigkeit führt. Bereits in früheren Studien wurde über den möglichen Einfluß einer veränderten Oberflächenladung auf die Aktivität und Spezifität einer Thermolysin-ähnlichen Protease berichtet [DE KREIJ et al., 2002].

Ebenso wie für *wt Trypsin* bzw. *Trp D189S/K60E* detektiert, stellt im Ergebnis der Hydrolysestudie von *Trp D194N* bzw. *Trp D194N/K60E* und *Trp D194N/D189S/K60E* der OCap-Ester das zweitbeste Substrat dar. Offensichtlich bestätigt sich durch diese Ergebnisse die bereits postulierte gute Substrateinpassung durch Wechselwirkung zwischen der OCap-Abgangsgruppe und Serin 189 und darüber hinaus auch Aspartat 189.

Nachfolgend wurde die Amidaseaktivität der vier Trypsin-Varianten wie zuvor beschrieben beurteilt. Obgleich für *Trp D194N/D189S* der OInd-Ester innerhalb der Hydrolyse-Studie formal das am schnellsten umgesetzte Substrat darstellt, ist der Unterschied zur Hydrolyserate des OGp-Mimetikums mit einem Faktor von 1,15 lediglich marginal. Daher wurde für die Modellsynthesen einheitlich das für Bz-Gly-OGp bereits etablierte System verwendet. Wie aus den Daten der Tabelle 4 ersichtlich ist, spaltet *Trp D194N* vorzugsweise nach Arginin und Lysin, ähnlich dem Wildtyp und bedingt somit lediglich Ausbeuten an intaktem Peptidprodukt von 29,1% unter Verwendung des Pentapeptids mit Arginin und 41,4% unter Verwendung des Acylakzeptors AAKAG. Demgegenüber erfolgte nach Tyrosin und Phenylalanin keine Spaltung. Die Ausbeute an Syntheseprodukt belief sich in diesen Fällen ähnlich wie beim Wildtyp auf ca. 80%. Auf Grund der hohen Amidaseaktivität gegenüber Peptidbindungen mit basischen Aminosäureseitenketten in P₁-Position scheint *Trp D194N* jedoch für synthetische Zwecke wenig geeignet. Offenbar ist eine Destabilisierung der Trypsin-Konformation durch den Austausch D194N allein nicht ausreichend, um die Aktivität des Katalysators von der Spaltung in Richtung Synthese zu verschieben.

Die Variante *Trp D194N/K60E* zeichnet sich im Vergleich zu *Trp D194N* durch eine verringerte proteolytische Aktivität gegenüber Arg-Xaa und Lys-Xaa Bindungen aus, in Folge dessen die Ausbeuten an intaktem Peptidprodukt unter Verwendung des Acylakzeptors AAKAG mit 71,6% um ca. 30% und für AARAG mit 53,3% um ca. 20%

Tab. 4: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-OGp auf Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *Trp D194N*, *Trp D194N/K60E*, *Trp D194N/D189S* bzw. *Trp D194N/D189S/K60E*.

Acyldonor/Enzym	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
<i>Trp D194N</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	42,4 (80,1)	6,7
	AARAG	29,1 (81,3)	3,4
	AAFAG	82,2 (82,2)	k.S.
	AA YAG	81,9 (81,9)	k.S.
<i>Trp D194N/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	71,6 (83,0)	11,5
	AARAG	53,3 (84,1)	4,9
	AAFAG	83,5 (83,5)	k.S.
	AA YAG	84,0 (84,0)	k.S.
<i>Trp D194N/D189S</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	67,3 (67,3)	176
	AARAG	60,1 (61,9)	120
	AAFAG	64,5 (64,5)	132
	AA YAG	66,2 (68,9)	80
<i>Trp D194N/D189S/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	69,4 (71,9)	132
	AARAG	84,0 (84,3)	198
	AAFAG	73,8 (75,2)	192
	AA YAG	72,1 (74,5)	131

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D194N*]: $6,0 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D194N/K60E*]: $3,0 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D194N/D189S*]: $1,5 \times 10^{-4}$ M; [*Trp D194N/D189S/K60E*]: $6,5 \times 10^{-5}$ M

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acyldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes, k.S.: keine Spaltung; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

höher sind als die der analogen *Trp D194N*-katalysierten Reaktionen. Die zusätzliche Mutation K60E hat somit nicht nur Auswirkung auf die Hydrolyse von Substratmimetika, sondern kann ebenfalls die proteolytische Spaltung der Syntheseprodukte nach Arginin und Lysin vermindern, wie bereits für *Trp D189S/K60E* diskutiert wurde (vgl. Tab. 3). Ebenso wie *Trp D194N* akzeptiert *Trp D194N/K60E* keine aromatischen Aminosäureseitenketten in der primären Substratbindungstasche, wie die Stabilität der Produkte Bz-GAAYAG bzw. Bz-GAAFAG belegt. Dennoch stellt die, wenn auch verminderte, proteolytische Aktivität von *Trp D194N/K60E* vor allem gegenüber Arginin ein potentiell Risiko bei der Durchführung von Synthesereaktionen dar.

Die Variante *Trp D194N/D189S* besitzt erwartungsgemäß auf Grund des fehlenden Asparaginsäurerestes am Grund der S_1 -Bindungstasche verglichen mit *Trp D194N* und *Trp D194N/K60E* eine signifikant verminderte Präferenz für die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, wobei das Produkt Bz-GAAKAG stabiler ist als Bz-GAARAG. Die Ausbeuten in den Acyltransferreaktionen beliefen sich auf 67,3% für Bz-GAAKAG und 60,1% für Bz-GAARAG. Gegenüber der Variante *Trp D189S* erfolgt bezogen auf diese Synthesereaktionen jedoch eine weniger effiziente Knüpfung. Die proteolytische Spaltung des Produktes Bz-GAAYAG ist im Vergleich zur Ausgangsvariante *Trp D189S* (vgl. Tab. 3) ebenfalls signifikant vermindert, wobei der Anteil an intaktem Peptidprodukt in dieser Reaktion ca. 66% betrug. Im Vergleich zum *wt Trypsin* bzw. *Trp D194N* erfolgte die Knüpfungsreaktion auf den Acylakzeptor AAFAG bei einer Ausbeute von ca. 64% mit geringerer Effizienz. Eine Spaltung des Bz-AAFAG Peptides erfolgte durch *Trp D194N/D189S* nur in sehr geringem Umfang. Die zum Teil verminderten Produktausbeuten im Vergleich zu anderen Trypsin-Varianten können durch eine generelle Abnahme der Nukleophilakzeptanz, wie eigene Ergebnisse des S_1' -subsite-mapping belegen erklärt werden. Der kombinierte Austausch zweier Aminosäuren in *Trp D194N/D189S* führte somit wie erhofft zu einer Protease mit verminderter Trypsin- und Chymotrypsin-Spaltaktivität, wenngleich die Synthesereaktionen mit verminderter Effizienz katalysiert werden.

In Kombination mit Glu⁶⁰ konnte unter Verwendung von *Trp D194N/D189S/K60E* verglichen mit *Trp D194N/D189S* eine Erhöhung der Ausbeute (vgl. Tab. 4) um 2% (Bz-GAAKAG), 24% (Bz-GAARAG), 9% (Bz-GAAFAG) bzw. 6% (Bz-GAAYAG) erzielt werden. Die signifikante Ausbeutesteigerung unter Verwendung des Peptides

mit zentralem Arginin kann darauf zurückgeführt werden, daß durch Glu⁶⁰ eine starke Präferenz für Arginin sowohl in der S₁'- als auch der S₃'-Bindungsregion hervorgerufen wird [KURTH et al., 1998], da bekanntlich im Trypsin beide Bindungsorte überlappen. Demnach könnte das Pentapeptid mit Arginin in P₃'-Position durch Wechselwirkungen mit Glu⁶⁰ bei der Substrateinpassung profitieren. Alle vier durch *Trp D194N/D189S/K60E* synthetisierten Produkte zeichneten sich durch eine hohe Stabilität aus, was im Vergleich zu den analogen *Trp D194N/K60E* katalysierten Reaktionen bei annähernd gleicher Akzeptanz des Mimetikums maßgeblich auf einer verminderten Amidaseaktivität des verwendeten Katalysators beruhen sollte.

Auf Grund dieser positiven Befunde wurden weitere *Trp D194N/D189S/K60E* – katalysierte Modellreaktionen unter Verwendung von Guanidinophenylestern mit variabler P₁-Aminosäure durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse (s. Tab. 5) belegen, daß die *Trp D194N/D189S/K60E*-katalysierten Synthesen unabhängig von der Aminosäuren in P₁-Position erfolgen. Abweichungen in den Ausbeuten, die auch unter Verwendung des nativen Katalysators auftreten, liegen in Abhängigkeit der individuellen P₁-Aminosäure des Substratmimetikums bei max. 30% sowie in Abhängigkeit vom Acylakzeptor bei ca. 10%. Auf Grund der in vorangegangenen Synthesereaktionen detektierten marginalen Amidaseaktivität von *Trp D194N/D189S/K60E* wurde eine eventuelle sekundärhydrolytische Spaltung der Produkte nach längerer Inkubation nicht näher analysiert.

Trotz der praktisch auszuschließenden Amidaseaktivität dieses neuen Katalysators stellt die gegenüber dem *wt Trypsin* signifikant verminderte Syntheseaktivität auf Grund längerer Reaktionszeiten ein mögliches Problem im Hinblick auf die gegebene Zielstellung dar. So wird für Synthesereaktionen im Vergleich zum nativen Katalysator ca. 65-100mal mehr Enzym benötigt. Dieses Defizit wäre jedoch durch eine Erhöhung der Konzentration des Katalysators im Reaktionsansatz nur in begrenztem Umfang auszugleichen, da das Enzym-Substratverhältnis einen Wert von 1:10 nicht überschreiten sollte. Insbesondere im Hinblick auf die Modifizierung von Peptiden und Proteinen ist eine rasche Knüpfungsreaktion essentiell, um mögliche spontane Nebenreaktionen zu vermeiden und begründet die Suche nach potenteren Katalysatoren.

Tab. 5: Substratmimetika-vermittelter Acyltransfer von Guanidinophenylestern auf Pentapeptide katalysiert durch *Trp D194N/D189S/K60E*.

Acyldonor	Acylakzeptor	Produktausbeute [%]
Bz-Gly-OGp	AAKAG	69,2
	AARAG	84,1
	AAFAG	74,5
	AA YAG	71,8
Bz-Leu-OGp	AAKAG	51,7
	AARAG	56,1
	AAFAG	62,3
	AA YAG	60,2
Bz-Phe-OGp	AAKAG	74,1
	AARAG	75,7
	AAFAG	69,3
	AA YAG	67,6
Boc-Phe-Gly-Gly-OGp	AAKAG	77,8
	AARAG	85,3
	AAFAG	81,9
	AA YAG	83,7

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D194N/D189S/K60E*]: 6,5 x 10⁻⁵ M

3.2.4. Trypsin-Varianten mit modifizierter S₁-Bindungstasche

3.2.4.1. Eliminierung der Disulfidbrücke Cys¹¹⁹-Cys²²⁰ in *Trp C191A*

Wie aus den Hydrolysestudien (s. Abb. 13) hervorgeht, führt die Deletion der Disulfidbrücke in *Trp C191A* trotz intaktem Asp¹⁸⁹ zu einer relativ unspezifischen Trypsin-Variante mit lediglich ca. 0,5% der esterolytischen Aktivität des nativen Trypsins und ca. 30% der esterolytischen Aktivität von *Trp D194N*. Dies impliziert, daß die Substratbindung vermutlich hauptsächlich durch Interaktionen des Aromatenringes mit der S₁-Bindungstasche und weniger durch die Substituenten

vermittelt wird. Als Ursache des signifikanten Aktivitätsverlustes ausgehend vom *wt Trypsin* kann eine Destabilisierung der Konformation des S_1 -Bindungsbereiches angesehen werden, da die Disulfidbrücke zwischen beiden Cysteinen zwei Segmente der S_1 -Bindungstasche miteinander verbindet. Die schwach erhöhte Präferenz für den OGp-Ester könnte auf minimale Wechselwirkungen der basischen Guanidinfunktion mit dem Asp¹⁸⁹, ähnlich wie im *wt Trypsin*, beruhen. Dabei wird am Beispiel von *Trp C191A* einmal mehr deutlich, daß die korrekte Positionierung der zu spaltenden Bindung durch das Aspartat 189 allein nicht vermittelt werden kann, sondern daß in diesem Prozeß die Wände der S_1 Bindungstasche sowie weitere Strukturelemente mitwirken.

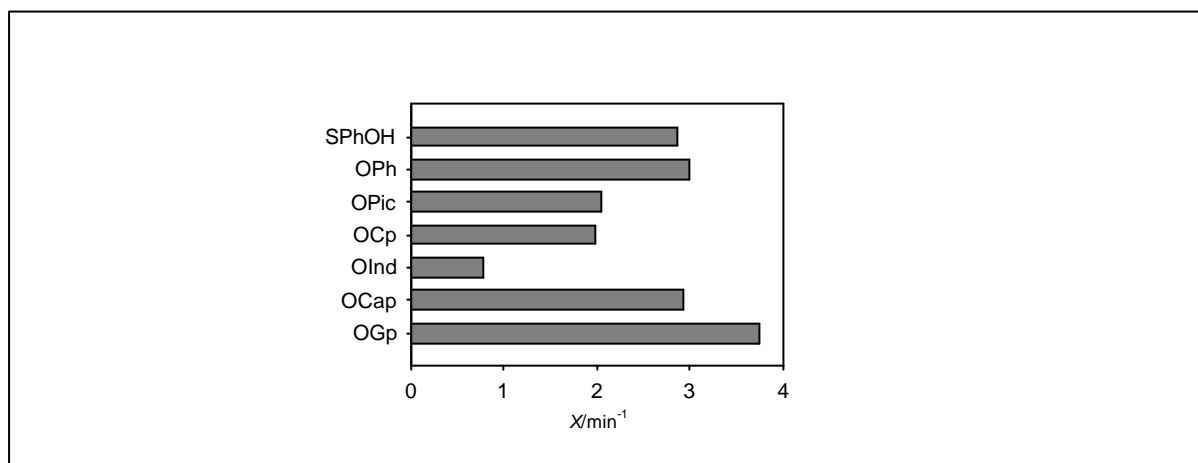


Abb.: 13 Initiale Geschwindigkeiten X/min^{-1} der Hydrolyse von Substratmimetika des Typs Boc-Ala-OR/SR katalysiert durch *Trp C191A*.

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , 30 °C, 8% DMF, [Boc-Ala-OR/SR]: 2 mM, [*Trp C191A*]: $8,0 \times 10^{-6}$ M

Interessanter Weise wirkt sich die Destabilisierung der S_1 -Bindungstasche in *Trp C191A* auf die Aktivität des Katalysators prägnanter aus als die Ausbildung einer Zymogen-ähnlichen Konformation in *Trp D194N*, was erklärt werden könnte mit einem von WANG et al. beobachteten Defekt im Acylierungsschritt [WANG et al., 1997]. Weiterhin wurde der Disulfidbrücke Cys¹⁹¹-Cys²²⁰ von WANG eine Beteiligung bei der Stabilisierung des Übergangszustandes während der Katalyse zugesprochen, was gleichermaßen den Aktivitätsverlust von *Trp C191A* gegenüber den Estersubstraten erklären könnte.

Unter Verwendung des Bz-Gly-OGp-Esters wurde nachfolgend die

Amidaseaktivität des Katalysators untersucht. Die Daten der Acyltransferexperimente (vgl. Tab. 6) belegen unter Verwendung der Nukleophile AAKAG bzw. AARAG eine gegenüber dem Wildtyp deutlich verminderte proteolytische Spaltung der entsprechenden synthetisierten Peptidprodukte. Hieraus resultiert eine signifikante Steigerung der Ausbeute an Bz-GAAKAG um ca. 30% und an Bz-GAARAG um ca. 48% im Vergleich zum *wt Trypsin* und der Variante *Trp D194N*. Im Rahmen dieser beiden Synthesereaktionen wirkt sich die Eliminierung der Disulfidbrücke auf die proteolytische Aktivität des Katalysators gegenüber basischen Aminosäureresten in P₁-Position prägnanter aus als die Induktion einer Zymogen-ähnlichen Konformation in *Trp D194N*.

Tab. 6: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-OGp auf Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *Trp C191A*.

Acyldonor	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
Bz-Gly-OGp	AAKAG	73,1 (92,4)	12,6
	AARAG	71,9 (91,5)	10,3
	AAFAG	77,3 (92,0)	15,7
	AA YAG	53,8 (95,2)	7,1

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp C191A*]: 1,5 x 10⁻⁵ M

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acyldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

Unter Verwendung des Acylakzeptors AA YAG konnte im Gegensatz zum *wt Trypsin* und der Variante *Trp D194N* nur temporär eine Produktakkumulation erreicht werden. Der Anteil an intaktem Syntheseprodukt Bz-GAA YAG betrug 53,8% und entspricht einer Verminderung der Ausbeute von ca. 30% verglichen mit der nativen Protease. Demgegenüber wurde das Syntheseprodukt Bz-GAAFAG in geringerem Maß von *Trp C191A* proteolytisch gespalten.

Die erhaltenen Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit literaturbekannten Daten unter Verwendung von Standardsubstraten. So konnte ein 10² bis 10⁴facher Verlust

Trypsin-spezifischer Aktivität gegenüber basischen Seitenketten in P₁-Position des Substrates und eine signifikante Erhöhung in der Aktivität gegenüber Chymotrypsin-spezifischen Substraten beobachtet werden [VARALLYAY et al., 1997].

Die Variante *Trp C191A* weist somit neben der breiten Akzeptanz verschiedener Abgangsgruppenstrukturen auch eine relativ hohe unspezifische Amidaseaktivität sowohl für basische als auch aromatische Aminosäureseitenketten auf, so daß *Trp C191* den Ansprüchen an eine Peptidligase nicht gerecht wird.

3.2.4.2. Trypsin-Varianten mit Elastase-ähnlicher S₁-Bindungsregion

Trp D189S/G216V, *Trp D189S/G226T*, *Trp D189S,G216V/G226T*

Trp D189S/G216V/K60E, *Trp D189S/G226T/K60E*, *Trp D189S/G216V/G226T/K60E*

Die Ergebnisse der Hydrolysestudien weisen die Varianten *Trp D189S/G216V* und *Trp D189S/G216V/G226T* als relativ unspezifische Enzyme aus mit einer geringen Präferenz für den Boc-Ala-OCap-Ester (vgl. Abb. 14). Abgeleitet von diesem Befund sollte die Einpassung der verwendeten Substrate überwiegend durch Wechselwirkungen des Phenylgrundkörpers der Abgangsgruppen mit der S₁-Bindungsregion vermittelt werden. Da die Variante *Trp D189S/G226T* deutlich zwischen den verschiedenen Substraten diskriminiert, erlangen in diesem Fall die Substituenten der Abgangsgruppen größere Bedeutung für die Substrateinpassung. Dabei wird der Boc-Ala-OCap-Ester um den Faktor 3 bis 5 gegenüber den anderen Substraten bevorzugt hydrolysiert. Weiterhin auffallend bei dieser Variante ist die erhöhte Hydrolyserate der Mimetika mit den basischen Abgangsgruppen OPic und OGP sowie der SphOH-Abgangsgruppe. Allgemein zeigt die Variante *Trp D189S/G226T* deutlich höhere Hydrolysegeschwindigkeiten im Vergleich zu *Trp D189S/G216V* und *Trp D189S/G216V/G226T*. Diese hohe esterolytische Aktivität von *Trp D189S/G226T* könnte dabei auf das Vorhandensein von Gly²¹⁶ zurückzuführen sein, welches in den anderen beiden Varianten ausgetauscht wurde. Wie bereits im Abschnitt 2.2.3.2. diskutiert, ermöglicht die Rückgratkonformation des Glycin 216 eine korrekte Positionierung der zu spaltenden Bindung in Bezug auf das katalytische Serin [PERONA et al., 1995]. Anhand der Kristallstrukturen von *Trp D189S*, *Trp D189G/G226T* und *Trp G226A* konnte gezeigt werden, daß sich Veränderungen in Position 189 und 226 innerhalb der S₁-Bindungstasche von Trypsin nicht auf die Konformation von Gly²¹⁶ auswirken [PERONA et al., 1993, 1994;

WILKE et al., 1991], so daß dieser Rest theoretisch in der Variante *Trp D189S/G226T* für eine optimale Positionierung des Substrates zur Verfügung stehen sollte.

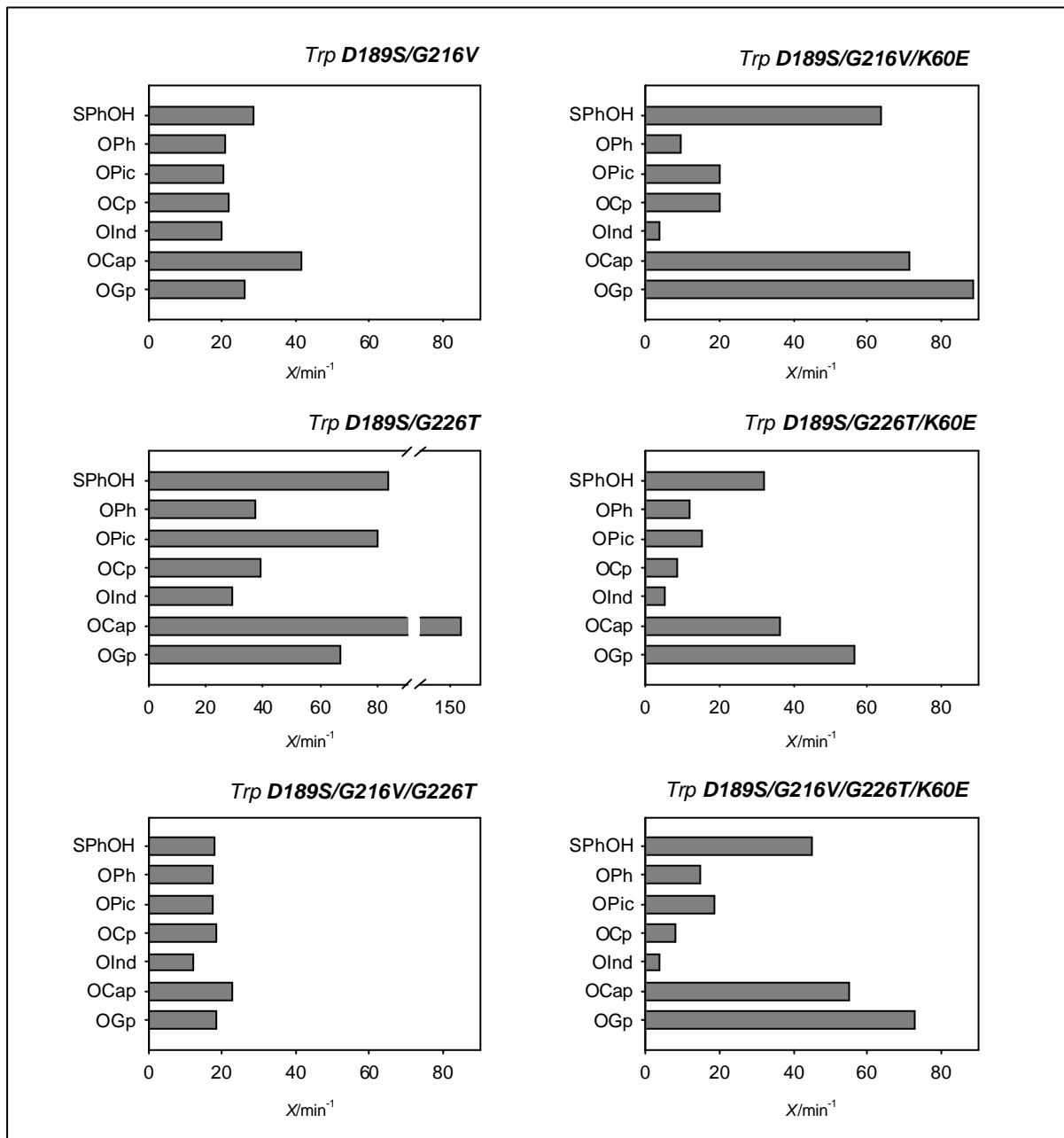


Abb. 14: Initiale Geschwindigkeiten X/min^{-1} der Hydrolyse ausgewählter Substratmimetika des Typs Boc-Ala-OR/SR katalysiert durch *Trp D189S/G216V*, *Trp D189S/G226T*, *Trp D189S/G216V/G226T*, *Trp D189S/G216V/K60E*, *Trp D189S/G226T/K60E* und *Trp D189S/G216V/G226T/K60E*.

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , 30 °C, 8% DMF, [Boc-Ala-OR/SR]: 2 mM; [*Trp D189S/G216V*]: $1,2 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D189S/G226T*]: $2,4 \times 10^{-6}$ M; [*Trp D189S/G216V/G226T*]: $1,2 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D189S/G216V/K60E*]: $4,6 \times 10^{-6}$ M; [*Trp D189S/G226T/K60E*]: $2,0 \times 10^{-6}$ M; [*Trp D189S/G216V/G226T/K60E*]: $5,5 \times 10^{-6}$ M

Unter der Annahme, daß der Rest Thr²²⁶ von der S₁-Bindungsregion abgewandt ist, wäre die primäre Bindungstasche für die Esterabgangsgruppen analog der Ausgangsvariante *Trp D189S* frei zugänglich. Dennoch bedingt der zusätzliche Austausch G226T einen allgemeinen Anstieg der esterolytischen Aktivität gegenüber verschiedenen Substratmimetika um den Faktor 10 bis 50 im Vergleich zu *Trp D189S*. Dies deutet insbesondere in Zusammenhang mit einer beobachteten Spezifitätsverschiebung von der OGp (*Trp D189S*) zur OCap Abgangsgruppe (*Trp D189S/G226T*) auf eine veränderte Substrateinpassung bedingt durch Thr²²⁶ hin. Der Austausch von Gly²¹⁶ gegen Val in *Trp D189S/G216V* und *Trp D189S/G216V/G226T* führt dagegen überwiegend zu einer Verminderung der esterolytischen Aktivität im Vergleich zu *Trp D189S/G226T*. Möglicherweise erfolgt die Positionierung der zu spaltenden Bindung auf Grund des modifizierten Restes 216 weniger produktiv. Dieser generelle Aktivitätsverlust durch den Austausch G216V ist ebenso in Literatur-bekanntem Studien dokumentiert [CRAIK et al., 1985]. Verglichen mit der Ausgangsvariante *Trp D189S* verläuft die Hydrolyse der Substratmimetika in Kombination mit G216V vermutlich als Folge einer veränderten Substratbindung dennoch ca. 6mal und in Kombination mit G226T (ohne G216V) ca. 10 bis 30mal effizienter.

Bei einer Gegenüberstellung der experimentellen Daten aus den Hydrolysestudien der um K60E erweiterten Kombinationsvarianten (vgl. Abb. 14) fällt auf, daß alle drei Katalysatoren ein ähnliches Spezifitätsprofil aufweisen. Somit werden der OGp-Ester, gefolgt von Boc-Ala-OCap und Boc-Ala-SPhOH am effizientesten hydrolysiert. Dabei führte die zusätzliche Modifizierung Glu⁶⁰ in den Varianten *Trp D189S/G216/K60E* und *Trp D189S/G216V/G226T/K60E* im Vergleich zu den Varianten mit intaktem Lys⁶⁰ zu einer Steigerung der Hydrolyserate um den Faktor 2 bis 3 bezogen auf die jeweils am besten akzeptierten Substrate. Lediglich für *Trp D189S/G226T/K60E* liegt die Hydrolyserate des OGp-Esters im selben Bereich verglichen mit der Ausgangsvariante *Trp D189S/G226T*. Bezogen auf den Boc-Ala-OGp-Ester besitzen die Trypsin-Varianten ca. 10-15% der esterolytischen Aktivität des nativen Trypsins. Signifikant verringert hat sich bei der Variante *Trp D189S/G226T/K60E* die Hydrolyserate für alle anderen Mimetika, einschließlich dem OCap-Ester, ca. um den Faktor 4. Wie bereits bei der Zymogen-ähnlichen Trypsinvariante *D189S/D194N* führte auch hier die zusätzliche Mutation K60E zu einer relativ ausgeprägten Spezifität für die OGp-Abgangsgruppe. Dabei scheint

Glu⁶⁰ die Substratbindung in allen Elastase-ähnlichen Kombinationsvarianten maßgeblich und in ähnlicher Weise zu beeinflussen, da alle ein sehr ähnliches Spezifitätsprofil aufweisen.

Für die Beurteilung der Amidaseaktivität der Kombinationsmutanten mit Glu⁶⁰ wurde in nachfolgenden Synthesereaktionen der Bz-Gly-OGp Ester verwendet, für die Ausgangsvarianten entsprechend den Ergebnissen der Esterhydrolysen das Substratmimetikum Bz-Ala-OCap. Im Vergleich der Ergebnisse in Tabelle 7 fällt zunächst auf, daß die Varianten *Trp D189S/G226T* sowie *Trp D189S/G216V/G226T* mit Produktausbeuten zwischen 3,2% und 33,4% keinen effizienten Acyltransfer vermitteln. Selbst die Produktausbeuten der Acyltransferreaktionen unter der Katalyse von *Trp D189S/G216V* sind im Vergleich zu bereits in dieser Arbeit diskutierten Varianten niedriger. So wirkt sich verglichen mit *Trp D189S* insbesondere die Modifizierung G226T und in geringerem Maß der Austausch G216V negativ auf die Acyltransfereffizienz des Katalysators aus. Die Amidaseaktivität ist in den Varianten *Trp D189S/G216V* sowie *Trp D189S/G216V/G226T* in Gegenüberstellung mit *Trp D189S/G226T* schwächer ausgeprägt, was auf eine veränderte Rückgratkonformation in Position 216 und damit bedingt eine weniger produktive Einpassung des Substrates analog literaturbekannten Studien [PERONA et al., 1993, 1994; WILKE et al., 1991] zurückgeführt werden kann.

Allgemein betrachtet tritt bei keiner der drei Varianten eine signifikante Bevorzugung basischer oder aromatischer Aminosäureseitenketten bei der Spaltung der Peptidprodukte auf. Die wenig effiziente Deacylierung der Katalysatoren durch die verwendeten Nukleophile könnte auf einer schlechten Einbindung der Acylakzeptoren beruhen. Insbesondere Interaktionen der Abgangsgruppe mit dem S₂'-Bindungsbereich könnten die vermutlich wichtigste Wechselwirkung zwischen Enzym- und Substratrückgrat in dieser Bindungsdomäne, die Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidstickstoff des P₂'-Restes und dem Carbonylsauerstoff von Phe⁴¹ [BIZZOZERO et al., 1982], stören. Auf der anderen Seite ist bekannt, daß Carboxamidomethylester von N^a-geschütztem Phenylalanin diese Wasserstoffbrücke bei der Bindung an *wt Trypsin* ausbilden und trotzdem ein effizienter Acyltransfer unter Verwendung dieser Substrate stattfinden kann. In der Chymotrypsin-katalysierten Knüpfung von Bz-Phe-OGp auf Nukleophile verschiedener Länge wurde ebenso ein, wenngleich geringer, kompetitiver Effekt zwischen

Tab. 7: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Ala-OCap auf Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *Trp D189S/G216V*, *Trp D189S/G226T* bzw. *Trp D189S/G216V/G226T*.

Acyldonor/Enzym	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
<i>Trp D189S/G216V</i>			
Bz-Ala-OCap	AAKAG	54,3 (56,3)	96
	AARAG	69,4 (71,4)	99
	AAFAG	58,8 (58,8)	268
	AA YAG	65,5 (65,5)	188
<i>Trp D189S/G226T</i>			
Bz-Ala-OCap	AAKAG	9,0 (12,7)	61
	AARAG	3,2 (7,4)	32
	AAFAG	15,3 (18,1)	81
	AA YAG	11,5 (15,6)	61
<i>Trp D189S/G216V/G226T</i>			
Bz-Ala-OCap	AAKAG	21,3 (21,3)	120
	AARAG	23,7 (23,7)	172
	AAFAG	26,0 (26,0)	170
	AA YAG	33,4 (33,4)	164

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D189S/G216V*]: $1,9 \times 10^{-5}$ M, [*Trp D189S/G226T*]: $2,3 \times 10^{-6}$ M, [*TrpD189S/G216V/G226T*]: $2,3 \times 10^{-5}$ M

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acyldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

Esterabgangsgruppe und Nukleophil beobachtet [GÜNTHER, 1998].

Durch Kombination der drei Ausgangsvarianten mit der Modifizierung Glu⁶⁰ konnte im Ergebnis der Synthesereaktionen interessanter Weise eine Erhöhung der Produktausbeute beobachtet werden (s. Tab. 8). Dies tritt vor allem bei der Variante *Trp D189S/G226T/K60E* mit einer Erhöhung des Anteils an intaktem Syntheseprodukt zwischen 22% und 38% signifikant hervor. Die mögliche Ursache

für den Ausbeute-steigernden Effekt der zusätzlichen Modifizierung K60E wurde bereits in vorangegangenen Kapiteln (3.2.2.; 3.2.3.2.) erläutert. Zudem führte die Substitution K60E für *Trp D189S/G226T/K60E* und *Trp D189S/G216V/G226T/K60E* gegenüber den Ausgangsvarianten ausnahmslos zu einem verbesserten Esterase-/Amidaseverhältnis. In den *Trp D189S/G216V/K60E*-katalysierten Synthesereaktionen ist die Stabilität der Peptidprodukte mit basischen Aminosäuren

Tab. 8: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-OGp auf Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *Trp D189S/G216V/K60E*, *Trp D189S/G226T/K60E* bzw. *Trp D189S/G216V/G226T/K60E*.

Acylldonor/Enzym	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
<i>Trp D189S/G216V/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	67,8 (67,8)	138
	AARAG	73,4 (73,4)	140
	AAFAG	63,9 (63,9)	202
	AA YAG	72,0 (72,0)	178
<i>Trp D189S/G226T/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	36,4 (37,8)	88
	AARAG	41,9 (42,1)	91
	AAFAG	38,3 (38,3)	121
	AA YAG	40,1 (40,1)	113
<i>Trp 189S/G216V/G226T/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	46,2 (47,0)	256
	AARAG	50,1 (50,1)	198
	AAFAG	45,7 (45,7)	410
	AA YAG	49,5 (49,5)	320

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acylldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D189S/G216V/K60E*]: $7,2 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189S/G226T/K60E*]: $1,7 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189S/G216V/G226T/K60E*]: $4,4 \times 10^{-6}$ M

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acylldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

größer im Vergleich zu der Ausgangsvariante *Trp D189S/G216V*, wohingegen die Aktivität gegenüber aromatischen Resten jedoch geringfügig erhöht ist.

Zusammenfassend geht aus diesem Abschnitt die Variante *Trp D189S/G216V/G226T/K60E* auf Grund des sehr guten Esterase-/Amidaseverhältnisses (s. Tab. 8) als ein aussichtsreicher Kandidat für weiterführende Modellreaktionen hervor. Verglichen mit *Trp D194N/D189S/K60E* ist die Syntheseeffizienz der Vierfachmutante zwar geringer, doch die Gefahr proteolytischer Nebenreaktionen in *Trp D189S/G216V/G226T/K60E*-katalysierten Synthesen wird geringer eingeschätzt. Unter Verwendung von Guanidinophenylestern mit variabler P₁-Aminosäure zeigte sich jedoch, daß die *Trp D189S/G216V/G226T/K60E*-katalysierten Synthesen nicht unabhängig vom P₁-Rest des verwendeten Esters ablaufen. So wird Bz-Gly-OGp von der Vierfachmutante signifikant schneller hydrolysiert als Bz-Phe-OGp bzw. Bz-Leu-OGp. (s. Abb. 15).

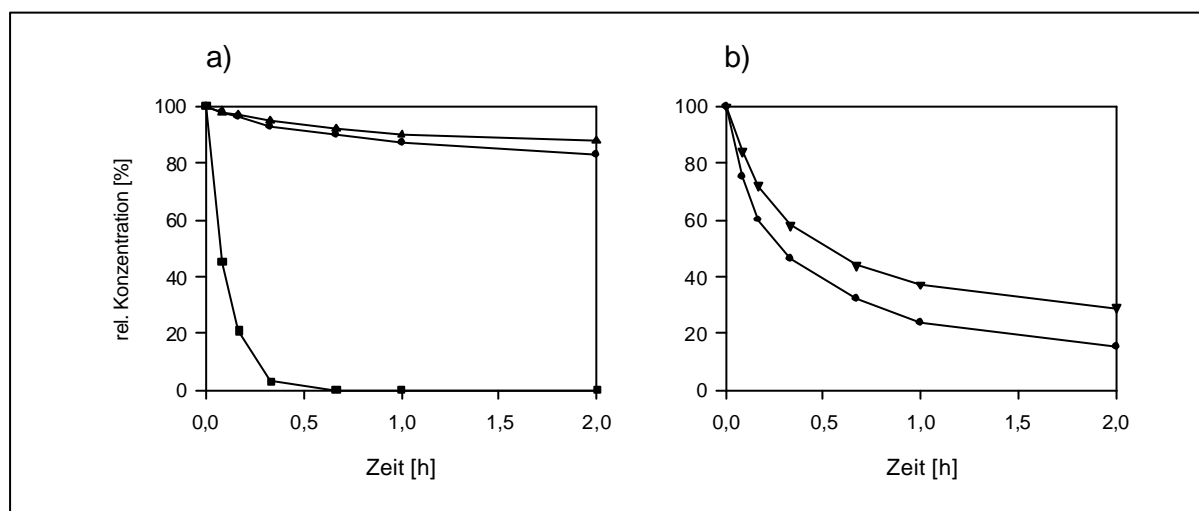


Abb. 15: *Trp D189S/G216V/G226T/K60E* katalysierte Hydrolyse von Guanidinophenylestern mit variabler P₁-Aminosäure. -□- Bz-Gly-OGp, -△- Bz-Leu-OGp, -○- Bz-Phe-OGp

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8 % DMF, [Bz-Xaa-OGp]: 2 mM, [*Trp D189S/G216V/G226T/K60E*]: a) = $4,4 \times 10^{-6}$ M, b) = $8,0 \times 10^{-5}$ M

Auf Grund dieser Restriktion ist *Trp D189S/G216V/G226T/K60E* im Rahmen des Substratmimetika-Konzeptes nicht universell einsetzbar. Zwar erfolgte die enzymatische Spaltung der Esterbindung von Bz-Phe-OGp und Bz-Leu-OGp unter Verwendung einer höheren Konzentration an *Trp D189S/G216V/G226T/K60E*

schneller (s. Abb. 15b), dennoch ist die katalytische Effizienz in diesen Fällen, verglichen mit *Trp D194N/D189S/K60E*, als vermindert einzustufen. Grundsätzlich besteht bei einem Einsatz höherer Enzymkonzentrationen weiterhin die Gefahr einer erhöhten Proteolyserate. Diese Befunde sind insbesondere im Hinblick auf praktische Anwendungen kritisch zu beurteilen, so daß keine weiterführenden Versuche wie z.B. Segmentkondensationen durchgeführt wurden.

3.2.4.3. Trypsin-Varianten mit basischer Aminosäure in Position 189

Trp D189K, Trp D189R, Trp D189H,
Trp D189K/K60E, Trp D189R/K60E, Trp D189H/K60E

Für die Variante *Trp D189K* konnte in ersten eigenen Experimenten in Übereinstimmung mit Literatur-bekanntem Daten [GRAF et al., 1987] unter Verwendung von kommerziellen Acyldonorestern eine Präferenz für aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin in P₁-Position des Substrates nachgewiesen werden. Dabei wurde Tyrosin in P₁-Position des Substrates besser akzeptiert als Phenylalanin, was auf Wechselwirkungen der OH-Gruppe der Tyrosinseitenkette mit Resten der S₁-Bindungstasche in *Trp D189K* zurückzuführen ist. Bei einem Strukturvergleich der Tyrosinseitenkette mit der SPhOH-Abgangsgruppe ist ein analoger Aufbau zu erkennen, so daß möglicherweise auf Grund dieser strukturellen Ähnlichkeit der Thioester als bestes Substrat aus den Studien der Esterhydrolyse hervorgeht (vgl. Abb. 16). Dieses Substratmimetikum wird von allen drei Varianten *Trp D189K, Trp D189R* und *Trp D189H* etwa 5-6 mal schneller hydrolysiert als vom *wt Trypsin*.

Allgemein betrachtet sind die drei genannten Varianten jedoch relativ unspezifische Enzyme, da der SPhOH-Ester nur geringfügig schneller hydrolysiert wird als die anderen verwendeten Mimetika. Dies impliziert, daß die Substratbindung vermutlich hauptsächlich durch Interaktionen der S₁-Bindungstasche mit dem Aromatenring und weniger durch die Substitutionen der jeweiligen Abgangsgruppe vermittelt wird. Im Vergleich zum *wt Trypsin* erreichen die Varianten *Trp D189K, Trp D189R* sowie *Trp D189H* ca. 0,5% der esterolytischen Aktivität.

Im Gegensatz zu den Einfachmutanten zeigen die doppelt substituierten Varianten *Trp D189H/K60E, Trp D189R/K60E* sowie *Trp D189K/K60E* eine Präferenz für das Mimetikum mit der OGp-Abgangsgruppe. Dabei ist die katalytische Aktivität der drei

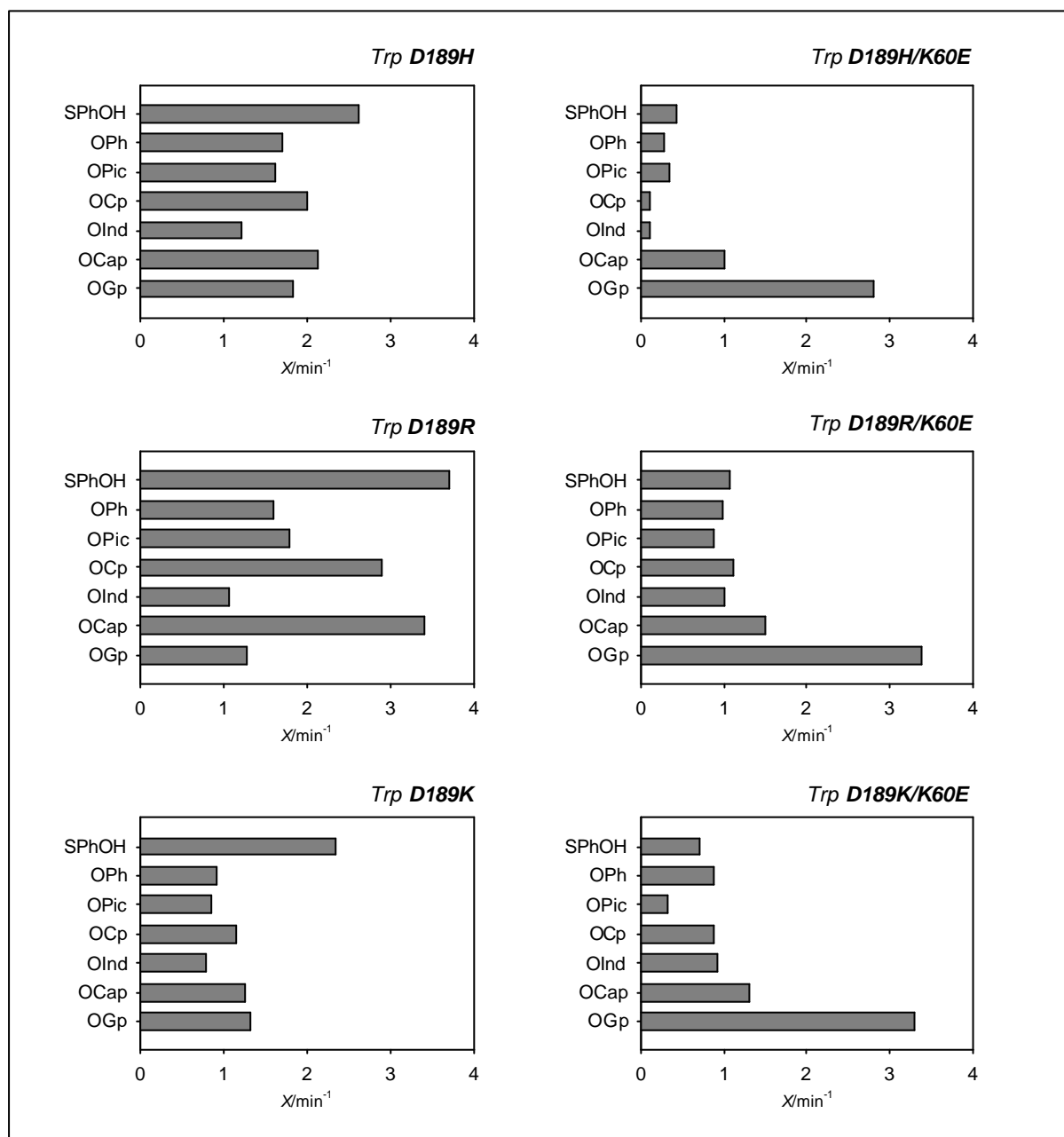


Abb. 16: Initiale Geschwindigkeiten X/min^{-1} der Hydrolyse ausgewählter Substratmimetika des Typs Boc-Ala-OR/SR katalysiert durch *Trp D189H*, *Trp D189R*, *Trp D189K*, *Trp D189H/K60E*, *Trp D189R/K60E* und *Trp D189K/K60E*.

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , 30 °C, 8 % DMF, [Boc-Ala-OR/SR]: 2 mM; [*Trp D189H*]: $1,6 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D189R*]: $1,9 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D189K*]: $1,2 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D189H/K60E*]: $1,9 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D189R/K60E*]: $4,0 \times 10^{-5}$ M; [*Trp D189K/K60E*]: $1,2 \times 10^{-5}$ M

Enzyme für diesen Ester etwa identisch und beträgt ca. 0,5% der esterolytischen Aktivität von nativem Trypsin. Diese Spezifitätsverschiebung hin zur OGp-Abgangsgruppe bei einem Austausch von K60E und gleichzeitig substituiertem

Asp¹⁸⁹ wurde bereits in vorangegangenen Kapiteln diskutiert und scheint ein generelles Phänomen derartiger Kombinations-Varianten zu sein. Darüber hinaus führt der Austausch K60E zu einer überwiegend schlechteren Akzeptanz aller anderen Abgangsgruppen bezogen auf die Ausgangsvarianten.

Für die Beurteilung der Amidaseaktivität von *Trp D189K*, *Trp D189R* sowie *Trp D189H* erfolgten Acyltransferreaktionen unter Verwendung eines Bz-Gly-SPhOH-Esters sowie des Bz-Gly-OGp-Mimetikums. Somit lässt sich der Einfluß der Abgangsgruppe auf die Synthesereaktionen dokumentieren und zum anderen ist ein direkter Vergleich zu den um Glu⁶⁰ erweiterten Varianten möglich. In den *Trp D189K/K60E*, *Trp D189R/K60E* bzw. *Trp D189H/K60E* katalysierten Synthesereaktionen wurde ausschließlich der Bz-Gly-OGp-Ester verwendet.

Für alle sechs getesteten Trypsin-Varianten konnte gegenüber der nativen Protease ein signifikant verbessertes Verhältnis von Esterase-/Amidaseaktivität detektiert werden (s. Tab. 9 u. 10). Generell ist bei einem Vergleich zwischen den Acyltransferdaten der drei Einfachvarianten unter Verwendung von Bz-Gly-OGp bzw. Bz-Gly-SPhOH festzustellen, daß die Ausbeuten ohne Ausnahme für das Mimetikum mit der spezifischeren SPhOH-Abgangsgruppe höher lagen und die Peptidprodukte stabiler waren als unter Verwendung des schlechter akzeptierten OGp-Mimetikums (vgl. Tab. 9 und 10). Dabei sind die Differenzen mit durchschnittlich 4-5% in den *Trp D189R*- bzw. *Trp D189H*-katalysierten Synthesen lediglich marginal, wohingegen in den *Trp D189K*-katalysierten Reaktionen zwischen beiden Acyldonorestern Abweichungen von ca. 12% auftraten. Da es bezogen auf den jeweiligen Katalysator unter Verwendung beider Substratmimetika zur Ausbildung identischer Acylenzyme kommt, sollten Unterschiede in den Ausbeuten vor allem im Fall von *Trp D189K* auf einen Einfluß der Esterabgangsgruppe auf den Reaktionsverlauf zurückzuführen sein. Ein derartiger Effekt wurde bereits für Chymotrypsin beschrieben [GÜNTHER, 1998].

Allgemein betrachtet katalysieren *Trp D189K*, *Trp D189R* sowie *Trp D189H* einen Acyltransfer in effizienter Weise mit Peptidausbeuten zwischen 63% und 94%. Somit knüpfen diese Enzyme meist deutlich effektiver als die Varianten mit Elastase-ähnlicher S₁-Bindungsregion und die Zymogen-ähnlichen Trypsine. Obgleich bislang davon ausgegangen wurde, daß sich Modifizierungen des S₁-Bindungsortes von Trypsin nicht signifikant auf die Eigenschaften der S₁'-Bindungsregion auswirken [KURTH, 1998], könnte der beobachtete Effekt auf einer verbesserten Einbindung des

Tab. 9: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-OGp auf Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *Trp D189K*, *Trp D189R* bzw. *Trp D189H*.

Acyldonor/Enzym	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
<i>Trp D189K</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	71,1 (73,5)	119
	AARAG	70,9 (72,1)	128
	AAFAG	71,3 (74,0)	111
	AA YAG	65,8 (76,5)	91
<i>Trp D189R</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	71,2 (72,5)	168
	AARAG	74,1 (75,4)	184
	AAFAG	68,7 (71,5)	141
	AA YAG	65,8 (73,1)	85
<i>Trp D189H</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	89,9 (94,4)	101
	AARAG	90,3 (92,1)	120
	AAFAG	85,1 (92,9)	43
	AA YAG	73,6 (92,5)	27

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D189K*]: $5,1 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189R*]: $5,0 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189H*]: $7,2 \times 10^{-6}$ M

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acyldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

Nukleophils im Fall von *Trp D189K*, *Trp D189R* sowie *Trp D189H* beruhen. So zeigte sich in eigenen Untersuchungen des S₁'-Bindungsortes verschiedener Trypsin-Varianten, daß *Trp D189K* eine höhere Nukleophil-Effizienz besitzt als z.B. *Trp D194N* bzw. *Trp D194N/D189S* und darüber hinaus sogar ein verändertes Spezifitätsprofil in dieser Bindungsregion aufweist. Interessanterweise beeinflussen wahrscheinlich die einzelnen Mutationen die elektrostatischen Verhältnisse im aktiven Zentrum der Enzyme in unterschiedlicher Weise auf molekularer Ebene, so

daß sich solche Modifizierungen in der primären Bindungsregion auch auf weitere Bindungsorte des Trypsins auswirken können [HEDSTROM et al., 1996a].

Prinzipiell weisen alle drei Katalysatoren in den Bz-Gly-SPhOH vermittelten Synthesen ein geringfügig besseres Esterase-/Amidaseverhältnis auf als unter Verwendung von Bz-Gly-OGp. Dieser Befund kann, unter Einbeziehung der Ergebnisse der Hydrolysestudien, auf eine höhere Esteraseaktivität der drei Katalysatoren gegenüber dem Thioester zurückgeführt werden.

Tab. 10: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-SPhOH auf Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *Trp D189K*, *Trp D189R* bzw. *Trp D189H*.

Acyldonor/Enzym	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
<i>Trp D189K</i>			
Bz-Gly-SPhOH	AAKAG	80,2 (82,1)	202
	AARAG	85,0 (87,7)	192
	AAFAG	83,4 (85,9)	176
	AA YAG	81,4 (83,6)	123
<i>Trp D189R</i>			
Bz-Gly-SPhOH	AAKAG	74,6 (76,0)	173
	AARAG	82,3 (84,4)	188
	AAFAG	71,5 (72,3)	182
	AA YAG	75,0 (77,2)	117
<i>Trp D189H</i>			
Bz-Gly-SPhOH	AAKAG	90,3 (91,9)	234
	AARAG	92,4 (93,5)	264
	AAFAG	89,9 (92,2)	129
	AA YAG	82,5 (93,1)	37

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D189K*]: $4,4 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189R*]: $3,0 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189H*]: $6,6 \times 10^{-6}$ M

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acyldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

Eine proteolytische Spaltung der Peptidprodukte erfolgte sowohl unter Verwendung des Thioesters als auch des Guanidinophenylesters durch *Trp D189K*, *Trp D189R* bzw. *Trp D189H* vorzugsweise nach dem Tyrosinrest. Ausschlaggebend hierfür sollten Interaktionen der OH-Gruppe mit Bereichen der primären Bindungstasche der Katalysatoren sein, denn das Syntheseprodukt mit zentralem Phenylalanin erwies sich generell als stabiler. Dabei ist die relative Amidaseaktivität der Varianten *Trp D189R* bzw. *Trp D189K* gegenüber Tyrosin sehr gering verglichen mit *Trp D189S* und ebenfalls geringer als die der Variante *Trp D189H*.

Die Produkte mit zentralen basischen Seitenketten Bz-GAARAG bzw. Bz-GAAKAG wurden durch *Trp D189K*, *Trp D189R* bzw. *Trp D189H* wie erwartet nur geringfügig proteolytisch gespalten, denn die der nativen Protease eigene Präferenz für Arginin und Lysin in P₁-Position des Substrates ist bei den Varianten *Trp D189K* und *Trp D189H* nicht ausgeprägt [GRAF et al., 1987, BRIAND et al., 1999, WILLET et al., 1995].

Die Ergebnisse der Synthesereaktionen der um Glu⁶⁰ erweiterten Katalysatoren (s. Tab. 11) verdeutlichen zwei Dinge: zum einen erfolgt auf Grund ausnahmslos höherer Ausbeuten ein effizienterer Acyltransfer (auch im Vergleich mit den Thioester-vermittelten Reaktionen der Einzelmutanten) und zum anderen sind die synthetisierten Peptidprodukte bis auf wenige Ausnahmen stabiler. Dies steht in Übereinstimmung mit diskutierten Daten aus vorangegangenen Modellreaktionen (vgl. 2.2.3.1.; 2.2.3.2.) und gilt auch im Vergleich der Varianten *Trp D194N/D189S* und *Trp D194N/D189S/K60E*. Es weisen alle drei Varianten *Trp D189K/K60E*, *Trp D189R/K60E* bzw. *Trp D189H/K60E* ein gegenüber den Einzelmutanten ein im Durchschnitt verbessertes Esterase/Amidase-Verhältnis auf, was in Anbetracht der Hydrolysestudie teilweise auf einer erhöhten Esteraseaktivität gegenüber dem Guanidinophenylester beruhen kann. Dabei stellt entsprechend der Primärspezifität der Katalysatoren der Tyrosinrest innerhalb des synthetisierten Peptidproduktes vor allem für *Trp D189H/K60E* die empfindlichste Spaltstelle dar.

Die Variante *Trp D189K/K60E* zeigt in Anbetracht des sehr guten Esterase/Amidase-Verhältnisses sowie einer ausgesprochen hohen Acyltransfereffizienz die nötigen Voraussetzungen für weitere anwendungsbezogene Acyltransferexperimente. Sie lieferte die höchsten Ausbeuten an synthetisierten Peptiden aller in dieser Arbeit getesteten Katalysatoren und wird im Hinblick auf die gegebene Zielstellung in nachfolgenden Kapiteln näher charakterisiert.

Tab. 11: Ergebnisse der Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-OGp auf Pentapeptide mit sensitiven Spaltstellen katalysiert durch *Trp D189K/K60E*, *Trp D189R/K60E* bzw. *Trp D189H/K60E*.

Acyldonor/Enzym	Acylakzeptor	Produkt [%]	$V_{iEster}/V_{iProdukt}$
<i>Trp D189K/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	97,2 (97,2)	492
	AARAG	98,0 (98,0)	540
	AAFAG	96,4 (97,1)	182
	AA YAG	92,5 (94,6)	125
<i>Trp D189R/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	90,8 (90,8)	1206
	AARAG	92,3 (92,3)	1188
	AAFAG	88,2 (90,9)	130
	AA YAG	84,4 (91,0)	86
<i>Trp D189H/K60E</i>			
Bz-Gly-OGp	AAKAG	85,1 (85,1)	180
	AARAG	88,3 (88,3)	183
	AAFAG	91,6 (91,6)	200
	AA YAG	81,3 (92,3)	53

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D189K/K60E*]: $6,5 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189R/K60E*]: $7,5 \times 10^{-6}$ M, [*Trp D189H/K60E*]: $5,0 \times 10^{-6}$ M

$V_{iEster}/V_{iProdukt}$: Quotient aus der initialen Hydrolyserate des Acyldonoresters und der initialen Hydrolyserate des intakten Peptidproduktes; in Klammern: Summe an intaktem und proteolytisch gespaltenem Syntheseprodukt

3.3. Enzymologische Charakterisierung der Variante *Trp D189K/K60E*

3.3.1. Bestimmung kinetischer Parameter der Hydrolyse ausgewählter Ester- und Amidsubstrate

Unter Verwendung ausgewählter Ester- und Amidsubstrate (s. Tab. 12) erfolgten Hydrolysestudien zur Ermittlung individueller Konstanten für die Variante *Trp D189K/K60E* wobei zu Vergleichszwecken *wt-Trypsin*, *α -Chymotrypsin* und *Trp D189K* als Referenzen einbezogen wurden. Um die Ursache des im vorangegangenen Kapitel gefundenen Verhältnisses von Esterase-/Amidaseaktivität der Variante *Trp D189K/K60E* näher zu analysieren, galt es anhand der ermittelten Daten detaillierte Aussagen über die katalytische Effizienz des neuen Katalysators sowie über dessen Affinität gegenüber bestimmten Substraten zu ermitteln und in Zusammenhang mit den Referenzen zu diskutieren.

Die ermittelten Spezifitätskonstanten von *wt Trypsin* für Bz-Arg-OEt und Ac-Tyr-OMe belegen deutlich die signifikante Präferenz der nativen Protease für basische Aminosäuren in P₁-Position des Substrates. Dabei liegt die Spezifitätskonstante für Bz-Arg-OEt um ca. 5 Größenordnungen über der Konstante für Ac-Tyr-OMe. Die Ursachen hierfür begründen sich in der ca. 150fach geringeren Substrataffinität K_M von *wt Trypsin* gegenüber Ac-Tyr-OMe, zum überwiegenden Teil jedoch in dem signifikant geringeren (ca. 450fach) k_{cat} -Wert. Die strukturelle Grundlage für die Präferenz von *wt Trypsin* gegenüber basischen Resten in P₁-Position des Substrates bildet der Aspartatrest 189 am Grund der S₁-Bindungstasche. Dieser Rest gewährleistet sowohl eine hohe Bindungsaffinität (K_S) typischer Trypsinsubstrate als auch hohe Acylierungsraten (k_2) durch die korrekte Positionierung der zu spaltenden Bindung in Bezug auf das Oxyanionloch und die katalytische Ser-His Diade [PERONA et al., 1994; PERONA et al., 1995]. Die signifikant geringere katalytische Effizienz des nativen Katalysators gegenüber Ac-Tyr-OMe sollte neben der geringen Substrataffinität maßgeblich bedingt sein durch eine geringe Acylierungsrate. Diese stellt das Resultat einer inkorrekten Positionierung der zu spaltenden Bindung von Ac-Tyr-OEt in Bezug auf den katalytischen Apparat des Trypsins dar, da bekanntlich das Asp¹⁸⁹ die Ausrichtung von Substraten mit aromatischer Seitenkette in P₁-Position nicht begünstigt [PERONA et al., 1995; 1994, HEDSTROM 1994].

Tab. 12: Kinetische Parameter der *Trp D189K*-, *Trp D189K/K60E*-, *wt Trypsin*- und *Chymotrypsin*-katalysierten Hydrolyse ausgewählter Ester- und Amidsubstrate.
Spezifitätszentrum = kursiv

Substrat / Enzym	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
<i>wt Trypsin</i>			
Ac-Tyr-OMe	0,944	0,052	5,46 x 10 ¹
Bz-Arg-OEt	0,006	23,4	4,03 x 10 ⁶
Bz-Gly-OGp	0,070	6,38	9,10 x 10 ⁴
BzAAKAG	0,162	8,64	5,33 x 10 ⁴
BzAARAG	0,121	10,1	8,32 x 10 ⁴
<i>Trp D189K</i>			
Ac-Tyr-OMe	1,81	2,01	1,12 x 10 ³
Bz-Gly-OGp	2,41	0,118	4,89 x 10 ¹
Bz-Gly-SPhOH	2,27	0,215	9,47 x 10 ¹
AAFAG	3,26	0,058	1,79 x 10 ¹
AA YAG	2,79	0,063	2,26 x 10 ¹
BzAAKAG	2,16	0,025	1,16 x 10 ¹
BzAARAG	2,39	0,024	0,99 x 10 ¹
<i>Trp D189K/K60E</i>			
Ac-Tyr-OMe	1,90	1,900	1,00 x 10 ³
Bz-Gly-OGp	2,18	0,272	1,25 x 10 ²
Bz-Gly-SPhOH	2,07	0,114	5,53 x 10 ¹
AAFAG	2,67	0,029	1,07 x 10 ¹
AA YAG	2,66	0,045	1,67 x 10 ¹
BzAAKAG	3,17	0,013	0,41 x 10 ¹
BzAARAG	3,65	0,011	0,30 x 10 ¹
<i>α-Chymotrypsin</i>			
Ac-Tyr-OMe	0,024	72,6	3,02 x 10 ⁶
Bz-Gly-OGp	0,550	3,45	6,31 x 10 ³
AAFAG	0,182	11,17	6,14 x 10 ⁴
AA YAG	0,135	15,97	1,18 x 10 ⁵

Bedingungen: 25 mM MOPS (pH 7,6), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 1/10 – 10 K_M , [*Trp D189K*]: 7,6 x 10⁻⁷ – 7,6 x 10⁻⁶ M, [*Trp D189K/K60E*]: 7,2 x 10⁻⁷ – 9,1 x 10⁻⁶ M, [*wt Trp*]: 1,5 x 10⁻⁸ – 2,0 x 10⁻⁶ M, [*α-Chymotrp*]: 1,0 x 10⁻⁸ – 1,0 x 10⁻⁶ M, Fehler < 15%

Wie die Ergebnisse der Tab. 12 belegen, zieht zunächst der Austausch D189K sowohl in der Einzel- als auch in der Doppelmutante auf Grund der überwiegend hydrophoben S_1 -Bindungstasche eine Spezifitätsverschiebung hin zu aromatischen Aminosäuren in P_1 -Position des Substrates nach sich. Gleichzeitig wurde ein genereller Spezifitätsverlust der Trypsin-Varianten ausgehend vom nativen Katalysator ermittelt. Hierbei liegen die Spezifitätskonstanten der neuen Enzyme unter Verwendung von Ac-Tyr-OMe um mehr als 3 Größenordnungen niedriger als die für den Wildtyp ermittelte Konstante für das entsprechend spezifische Bz-Arg-OEt Substrat. Dies begründet sich in einer höheren Affinität des nativen Trypsins gegenüber Bz-Arg-OEt sowie einer höheren Hydrolyserate. Die Spezifitätskonstanten der Trypsin-spezifischen Amidsubstrate differieren zwischen nativer Proteasae und *Trp D189K* um ca. 3,5 Größenordnungen bzw. *Trp D189K/K60E* um mehr als 4 Größenordnungen. Ursache hierfür sind neben der detektierten verminderten Substrataffinität der beiden Varianten gegenüber Bz-AARAG bzw. Bz-AAKAG vor allem die für diese Substrate signifikant geringeren k_{cat} -Werte. Diese Ergebnisse sind wenig überraschend, da dem in den Varianten substituierten Aspartat 189 in Trypsin wie bereits erwähnt eine überaus bedeutende Rolle bei der Substratdiskriminierung beikommt. Durch eine Substitution von Asp¹⁸⁹ wird dem Katalysator die strukturelle Grundlage für eine hohe Substrataffinität und für die korrekte Positionierung der zu spaltenden Bindung typischer Trypsinsubstrate in Bezug auf das Oxyanionloch und die katalytische Ser-His Diade entzogen [PERONA et al., 1995]. Generell ist davon auszugehen, daß Modifizierungen der S_1 -Bindungstasche erfahrungsgemäß insbesondere die Acylierungsrate k_2 entsprechender Trypsin-Varianten beeinflussen [GRAF et al., 1988; HEDSTROM et al., 1992; HEDSTROM et al., 1994b; PERONA et al., 1994]. So wurde am Beispiel der Variante *Trp D189S* durch die Substitution des Aspartatrestes eine signifikante Verminderung der Acylierungsraten gegenüber P_1 -Lys und P_1 -Arg Substraten detektiert [PERONA et al. 1994; PERONA et al. 1995]. In Analogie zu diesen literaturbekannten Befunden können die signifikant geringeren k_{cat} -Werte für die Hydrolyse der Trypsin-spezifischen Amidsubstrate beider Trypsin-Varianten ebenso auf eine Verringerung der Acylierungsrate zurückgeführt werden. Dabei verläuft die Acylierung der Variante *Trp D189K/K60E* durch die verwendeten Amidsubstrate im Vergleich zu *Trp D189K* noch langsamer, da die entsprechenden k_{cat} -Werte der Doppelmutante als direktes Maß für die Acylierung kleiner sind. Ursache hierfür kann eine veränderte Substratbindung und Positionierung der zu

spaltenden Bindung in Bezug auf die katalytische Triade sein, bedingt durch den zusätzlichen Austausch K60E. Dies zeigten auch Ergebnisse von Computerbasierten Bindungsstudien, aus denen eine zwischen beiden Varianten differierende Anordnung des P₁-Arg-Restes des Substrates hervorgeht [LEMKE, 2001].

Aus den ermittelten Daten geht weiterhin hervor, daß *Trp D189K* bzw. *Trp D189K/K60E* für den Ac-Tyr-OMe Ester ca. 20fach spezifischer sind als *wt Trypsin* und folglich über dessen intrinsische Spezifität gegenüber diesem Substrat hinausgehen. Die k_{cat} -Werte für das Substrat Ac-Tyr-OMe sind für die Trypsin-Varianten in Bezug auf *wt Trypsin* um den Faktor 40, die K_M -Werte um den Faktor 2 erhöht. Folglich ist die im Vergleich zum Wildtyp höhere Spezifität der Trypsin-Varianten gegenüber Ac-Tyr-OMe auf eine gesteigerte Hydrolyserate zurückzuführen. Vermutlich erfolgt im Fall der Trypsin-Varianten verglichen mit dem nativen Trypsin eine veränderte Substratbindung, die wiederum zu einer besseren Positionierung der zu spaltenden Bindung des Substrates Ac-Tyr-OMe und somit zu einer höheren Acylierungsrate führen kann.

Es sei der Vollständigkeit wegen erwähnt, daß hohe Acylierungsraten selbstverständlich auch eine intakte katalytische Triade voraussetzen. Wie aus den Kristallstrukturen von *wt Trypsin*, *Chymotrypsin*, *Trp D189S* sowie anderer Trypsin-Varianten hervorgeht, existieren zwar detaillierte Unterschiede in der Struktur der S₁-Bindungstasche, diese haben jedoch keine Auswirkung auf die Anordnung der katalytischen Triade [PERONA et al., 1995]. Somit sollten sich die Veränderungen in der Spezifität der getesteten Trypsin-Varianten im Vergleich mit dem nativen Katalysator einzig auf die Auswirkungen der Substitution in der S₁-Bindungstasche, bzw. in der S₁' Bindungsregion zurückführen lassen.

Aus einem weiteren Vergleich geht hervor, daß *Trp D189K* bzw. *Trp D189K/K60E* bezogen auf Ac-Tyr-OMe lediglich ca. 0,03% der esterolytischen Spezifität von *a-Chymotrypsin* besitzen. Hierbei liegen die K_M -Werte für das Substrat Ac-Tyr-OMe der beiden Trypsin-Varianten um ca. 2 Größenordnungen über der des *a-Chymotrypsins*, so daß folglich eine geringe Affinität zum Substrat vorliegt. Die um den Faktor 36 geringeren k_{cat} -Werte für das Substrat Ac-Tyr-OMe sind Ausdruck einer verglichen mit *a-Chymotrypsin* geringen Hydrolyserate. Bezogen auf die Amidsubstrate AA YAG bzw. AAFAG besitzen *Trp D189K* bzw. *Trp D189K/K60E* ca. 0,01% der proteolytischen Spezifität von *a-Chymotrypsin*. Hierbei sind vor allem die um einen Faktor von 250 bis 350 signifikant verminderten k_{cat} -Werte der Varianten im

Vergleich zu *a-Chymotrypsin* hervorzuheben. Die K_M -Werte sind um den Faktor 20 erhöht, was eine verminderte Substrataffinität für die Trypsin-Varianten andeutet. Die Ursachen für die geringe Chymotrypsin-ähnliche Spezifität der neuen Katalysatoren liegt darin begründet, daß es nicht ausreicht den negativen Aspartatrest 189 aus dem S_1 -Bindungsort des Trypsins zu entfernen, um eine Chymotrypsin-artige Spezifität des Katalysators zu induzieren. So konnte von HEDSTROM (1992, 1994a, 1996) nachgewiesen werden, daß weitere Strukturelemente außerhalb der S_1 -Bindungstasche von Trypsin auszutauschen sind, um in entsprechenden Trypsin-Varianten die Spezifität gegenüber typischen Chymotrypsinsubstraten zu erhöhen. Dabei basierte eine Spezifitätserhöhung der Chymotrypsin-ähnlichen Mutanten gegenüber aromatischen Resten in P_1 -Position nur marginal auf einer erhöhten Substrataffinität entsprechender Substrate, zum weitaus größeren Teil jedoch auf einer erhöhten Acylierungsrate [HEDSTROM et al., 1992; HEDSTROM et al. 1994a]. Dies impliziert, da in keiner der Varianten Unterschiede in der Anordnung der katalytischen Triade gefunden wurden, daß Unterschiede in der Acylierungsrate der jeweiligen Enzyme sehr wahrscheinlich die Fähigkeit widerspiegeln, das Substrat korrekt zu positionieren [PERONA et al., 1995]. Somit sollten die im Vergleich zu *a-Chymotrypsin* niedrigen k_{cat} -Werte von *Trp D189K* bzw. *Trp D189K/K60E* für die Hydrolyse der Chymotrypsin-spezifischen Amidsubstrate AAFAG und AAYAG durch geringe Acylierungsraten bedingt sein, da in Analogie zu den literaturbekannten Befunden eine korrekte Positionierung der zu spaltenden Bindung in den neuen Katalysatoren unwahrscheinlich ist. Weiterhin geht aus literaturbekannten Studien hervor, daß *wt Trypsin*, *a-Chymotrypsin* und die Variante *Trp D189S* sich kaum in den Konstanten für die Deacylierung von Amidsubstraten unterscheiden, entgegen den signifikanten Unterschieden in den Acylierungsraten [HEDSTROM et al., 1994a]. Die ermittelten kinetischen Parameter für die Hydrolyse der Amidsubstrate belegen, daß *Trp D189K/K60E* in Korrelation mit den Ergebnissen von Abschnitt 3.2.4.3. tendenziell eine geringere Amidaseaktivität als *Trp D189K* aufweist. Für beide Varianten stellt der Tyrosinrest in P_1 -Position des Substrates, wie bereits im vorangegangenen Kapitel diskutiert, die jeweils sensitivste Spaltstelle dar. Die Ursache für die geringere Amidaseaktivität von *Trp D189K/K60E* im Vergleich zur Einzelmutante liegt im Fall der Trypsin-spezifischen Amidsubstrate in der geringeren Substrataffinität der Doppelmutante sowie verminderten k_{cat} -Werten begründet. Gegenüber den Amidsubstraten mit aromatischen P_1 -Resten weist *Trp*

D189K/K60E eine höhere Substrataffinität auf als die Ausgangsvariante. Demnach ist die geringere Spezifität der Doppelmutante gegenüber *AAFAG* bzw. *AA YAG* allein auf eine geringere Hydrolyserate k_{cat} (Acylierungsrate) zurückzuführen. Der Befund, daß Substrataffinität und katalytische Effizienz nicht zwangsläufig korrelieren müssen wurde bereits in der Literatur beschrieben [HEDSTROM, 1996a]. Möglicherweise wird die geringe Acylierungsrate der Doppelmutante durch die beiden Chymotrypsin-spezifischen Amidsubstrate durch eine veränderte Positionierung der zu spaltenden Bindung in Bezug auf die katalytische Triade durch den zusätzlichen Austausch *K60E* bedingt. Auf Grund unzureichender produktiver Wechselwirkungen zwischen den getesteten Substraten und der S_1 -Bindungstasche der neuen Katalysatoren erklärt sich weiterhin die allgemein verringerte Affinität sowohl für Trypsin- als auch Chymotrypsin-spezifische Ester- bzw. Amidsubstrate, die in den höheren K_M Werten Ausdruck finden.

Generell sind die Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M aller verwendeten Katalysatoren für das Substratmimetikum Bz-Gly-OGp bzw. Bz-Gly-SPhOH (*Trp D189K*) niedriger bezogen auf die spezifischen konventionellen Estersubstrate Ac-Tyr-OMe bzw. Bz-Arg-OEt (*wt Trypsin*). Dieser Unterschied ist bei den beiden Trypsin-Varianten mit 1 Größenordnung weniger ausgeprägt als beim *wt Trypsin* mit 1,5 und *a-Chymotrypsin* mit 2,5 Größenordnungen. Für die beiden nativen Katalysatoren sind dabei K_M und k_{cat} etwa gleichermaßen beeinflusst. Im Fall der Trypsin-Varianten beruht die verminderte katalytische Effizienz gegenüber dem Substratmimetikum maßgeblich auf der um ca. 1 Größenordnung verminderten Hydrolyserate k_{cat} . Unter der Annahme, daß bei der Hydrolyse kommerzieller Estersubstrate durch *wt Trypsin* und *a-Chymotrypsin* die Deacylierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, ist k_{cat} ein Maß für k_3 und K_M beschreibt K_S und die Acylierung k_2 . Gleiche Gesetzmäßigkeiten gelten auch für die Hydrolyse von Guanidinophenylestern durch *wt Trypsin* und *a-Chymotrypsin* [SEKIZAKI et al., 1996; THORMANN et al., 1999; GÜNTHER et al., 2000a]. Demnach ergibt sich im Fall beider nativer Katalysatoren auf Grund der, bezogen auf das jeweils spezifische konventionelle Estersubstrat, geringeren Substrataffinität gegenüber dem Mimetikum ein Einfluß auf die Substratbindung und Acylierungsrate. Dieser ist im Fall von *wt Trypsin* ausgeprägter als beim *a-Chymotrypsin* und stellt das Resultat der reversen Einbindung von Substratmimetika dar [THORMANN et al., 1999; GÜNTHER et al., 2000a]. Die durch den geringen k_{cat} gekennzeichnete

verminderte Deacylierungsrate der Substratmimetika bezogen auf spezifische konventionelle Estersubstrate wird ebenso bedingt durch das reverse Binden des Mimetikums und die für die Deacylierung notwendige Umlagerung (K_R , s. Abb. 6) des Acylrestes in den S-Bindungsbereich des Katalysators [THORMANN et al., 1999; GÜNTHER et al., 2000a]. Im Fall der Trypsin-Varianten differiert die Substrataffinität zwischen konventionellem Ester und Substratmimetikum lediglich marginal. Demzufolge liegen die unterschiedlichen Spezifitäten in den um ca. 1 Größenordnung differierenden k_{cat} -Werten begründet. Unter der Annahme, daß Substratmimetika in den Varianten nach dem gleichen Prinzip wie in *wt Trypsin* bzw. *a-Cyhmotrypsin* eingebunden werden, könnte die geringere Hydrolyserate auf die für die Deacylierung von Substratmimetika notwendige Umlagerung (K_R) des Acylrestes zurückgeführt werden.

Die ermittelten Daten belegen weiterhin, daß natives Trypsin gegenüber dem Bz-Gly-OGp Mimetikum bzw. den Amidsubstraten Bz-AARAG und Bz-AAKAG eine nahezu gleiche Spezifität aufweist, was die Instabilität des jeweiligen Syntheseproduktes in den vorangegangenen Acyltransferreaktionen (vgl. Tab. 2) erklärt. Demgegenüber ist die Spezifität von *Trp D189K/K60E* für Bz-Gly-OGp bzw. von *Trp D189K* für Bz-Gly-SPhOH um ca. 0,5 bis 1,5 Größenordnungen höher bezogen auf die Amidsubstrate. Für *Trp D189K* differieren die Spezifitätskonstanten für Bz-Gly-SPhOH und AAYAG um den Faktor 4,2 während *Trp D189K/K60E* für das Mimetikum Bz-Gly-OGp um den Faktor 7,5 spezifischer ist als für das Pentapeptid AAYAG und folglich ein besseres Esterase/Amidase-Verhältnis aufweist.

In Übereinstimmung mit den Daten aus Abb. 16 ist *Trp D189K* um den Faktor 2 spezifischer für den Thioester als für die basische OGp-Abgangsgruppe, was hauptsächlich durch einen höheren k_{cat} -Wert bedingt ist. Da beide Substratmimetika zur Ausbildung des gleichen Acylenzym (Bz-Gly-*Trp D189K*) führen, sollten sich folglich im Deacylierungsschritt keine Unterschiede ergeben, vorausgesetzt, die beiden Substrate werden vom Katalysator nach dem gleichen Mechanismen eingebunden. Damit begründen sich Differenzen in den Hydrolyseraten beider Substratmimetika auf Unterschiede in der Substratbindung (K_S) und/oder dem Acylierungsschritt. Folglich sind die für die Trypsin-Varianten ermittelten Hydrolyseraten nicht wie im Fall von *wt Trypsin* und *Chymotrypsin* ein Maß für die Deacylierungsrate k_3 , sondern vielmehr für die Acylierungsrate k_2 . Somit übt die Esterabgangsgruppe über die Substratbindung K_S bzw. über die Acylierung k_2 einen

Einfluß auf die Spezifität des Katalysators aus. Bekanntermaßen kann die Reaktivität des Esters einen direkten Einfluß auf die Acylierungsgeschwindigkeit nehmen, während die Esterstruktur hauptsächlich einen Beitrag zur Bindung des Substrates liefert und sich daher direkt auf die Bindungsenergie auswirkt. Weiterhin können Esterabgangsgruppen auch zur Stabilisierung des tetrahedralen Übergangszustandes beitragen und haben somit oft einen signifikanten Einfluß auf die Acylierungsgeschwindigkeit [FERSHT, 1995]. Basierend auf diesen Tatsachen könnte der höhere k_{cat} -Wert für Bz-Gly-SPhOH maßgeblich auf einer schnelleren Acylierung der Variante *Trp D189K*, bedingt durch den höheren Aktivierungsgrad des Thioesters, zurückzuführen sein. Andererseits wäre auf Grund der unterschiedlichen Struktur der SphOH- bzw. der OGp-Abgangsgruppe eine veränderte Substratbindung denkbar. Als Folge hiervon könnte sich für den Thioesters eine günstigere Positionierung der zu spaltenden Bindung ergeben, was letztendlich zu einer gesteigerten Acylierungsrate führen könnte.

Dem entgegen zeigt *Trp D189K/K60E* eine um den Faktor 2 höhere Spezifität für den Guanidinophenylester, ebenfalls bedingt durch einen höheren k_{cat} -Wert im Vergleich zu der für Bz-Gly-SPhOH ermittelten Hydrolyserate. Auch in diesem Fall kann bei Ausbildung des gleichen Acylenzyms (Bz-Gly-*Trp D189K/K60E*) und praktisch gleicher Deacylierung der höhere k_{cat} -Wert für Bz-Gly-OGp auf eine schnellere Acylierung des Enzyms zurückgeführt werden. Diese könnte auf einer veränderten Substrateinpassung und günstigeren Positionierung der zu spaltenden Bindung im Vergleich zum Thioester beruhen. Unter der Annahme, daß die primäre Bindungsregion in beiden Varianten gleich ist, sollten Unterschiede in der Spezifität wie bereits mehrfach diskutiert auf Glu⁶⁰ in der S₁'-Bindungsregion von *Trp D189K/K60E* beruhen. Um dieses Phänomen zu entschlüsseln, wurden Docking-Studien zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Glu⁶⁰ bei der Substratbindung durchgeführt. Hierbei wurde das Programm AutoDock [MORRIS et al., 1998], das bereits zur Untersuchung der Einbindung von Substratmimetika in Trypsin bzw. Chymotrypsin herangezogen wurde [THORMANN et al., 1999; ELSNER, 2000, GÜNTHER et al., 2000], verwendet. AutoDock ist ein Programmpaket, das speziell für die Untersuchung der Bindung kleiner flexibler Liganden an Makromoleküle entwickelt wurde. Ziel der Docking Studien war zu klären, welche bevorzugte Bindungsstelle das Substrat Boc-L-Ala-OGp in der Variante *Trp D189K/K60E* im Vergleich zu *Trp D189K* bzw. *wt Trypsin* einnimmt. Im Ergebnis der

Studien (s. Tab. 13) konnte für alle getesteten Enzyme übereinstimmend die S_1 -Bindungstasche als bevorzugter Bindungsort ermittelt werden.

Tab. 13: Ergebnisse der Docking-Experimente von Boc-L-Ala-OGp an verschiedene Trypsin-Varianten. (LEMKE, 2001)

G = berechnete freie Bindungsenergie, K_D = Dissoziationskonstante

Boc-L-Ala-OGp				
	S_1 -Position		S_1' -Position	
	G [kcal/mol]	K_D	G [kcal/mol]	K_D
<i>wt-Trypsin</i>	-11,75	$2,40 \cdot 10^{-9}$	-	-
<i>Trp D189K</i>	-11,15	$6,75 \cdot 10^{-9}$	-7,39	$3,90 \cdot 10^{-6}$
<i>Trp D189K/K60E</i>	-11,05	$7,90 \cdot 10^{-9}$	-9,44	$9,44 \cdot 10^{-7}$

Es zeigte sich, daß mit zunehmender Anzahl an Mutationen die errechnete freie Bindungsenergie für Boc-L-Ala-OGp in der S_1 -Bindungstasche zunimmt, was letztendlich bedeutet, daß die primäre Bindungstasche für das Substrat zunehmend „unattraktiver“ wird. Jedoch existiert in *Trp D189K/K60E* neben einer unproduktiven Bindung im S_1 -Bereich eine zweite, energetisch jedoch weniger günstige produktive Bindungstasche für Boc-L-Ala-OGp, die durch die Einführung der Mutation in dem S_1' -Bindungsbereich geschaffen wird (vgl. Abb. 17). Hierbei bindet das Mimetikum nicht mehr nach dem Konzept des inversen Substrates (s. Abb.6) sondern ähnlich natürlichen Substraten mit der Abgangsgruppe in S_1' . Folglich kann der Ligand in zwei unterschiedlichen Konformationen produktiv im aktiven Zentrum des Katalysators gebunden werden (Abb. 17), welche letztendlich beide zum acylierten Enzym im Übergangszustand der Hydrolyse führen sollten. Da es zwei alternative Möglichkeiten gibt, erhöht sich mit der Wahrscheinlichkeit, daß der Ligand in der „passenden“ räumlichen Konformation an das Enzym gebunden wird auch die Hydrolyserate des Substrates. Basierend auf diesem Befund könnte der für *Trp D189K/K60E* ermittelte im Gegensatz zu *Trp D189K* erhöhte k_{cat} -Wert für Bz-Gly-OGp nicht unbedingt auf eine in der Einzelreaktion schnellere Acylierung des Enzyms zurückgeführt werden, sondern auf einem summarischen Effekt beruhen.

Auch für *α -Chymotrypsin*, welches mit Asp⁶⁴ ebenfalls über eine negative Ladung im S₁'-Bindungsort verfügt, konnte in früheren Docking-Studien eine mögliche Einbindung des Liganden Boc-L-Ala-OGp mit der Abgangsgruppe im S₁'-Bereich des Enzyms ermittelt werden, obgleich die energetisch günstigste Bindung des Substrates Abgangsgruppen-vermittelt in der S₁-Bindungstasche erfolgte [GÜNTHER et al., 2000].

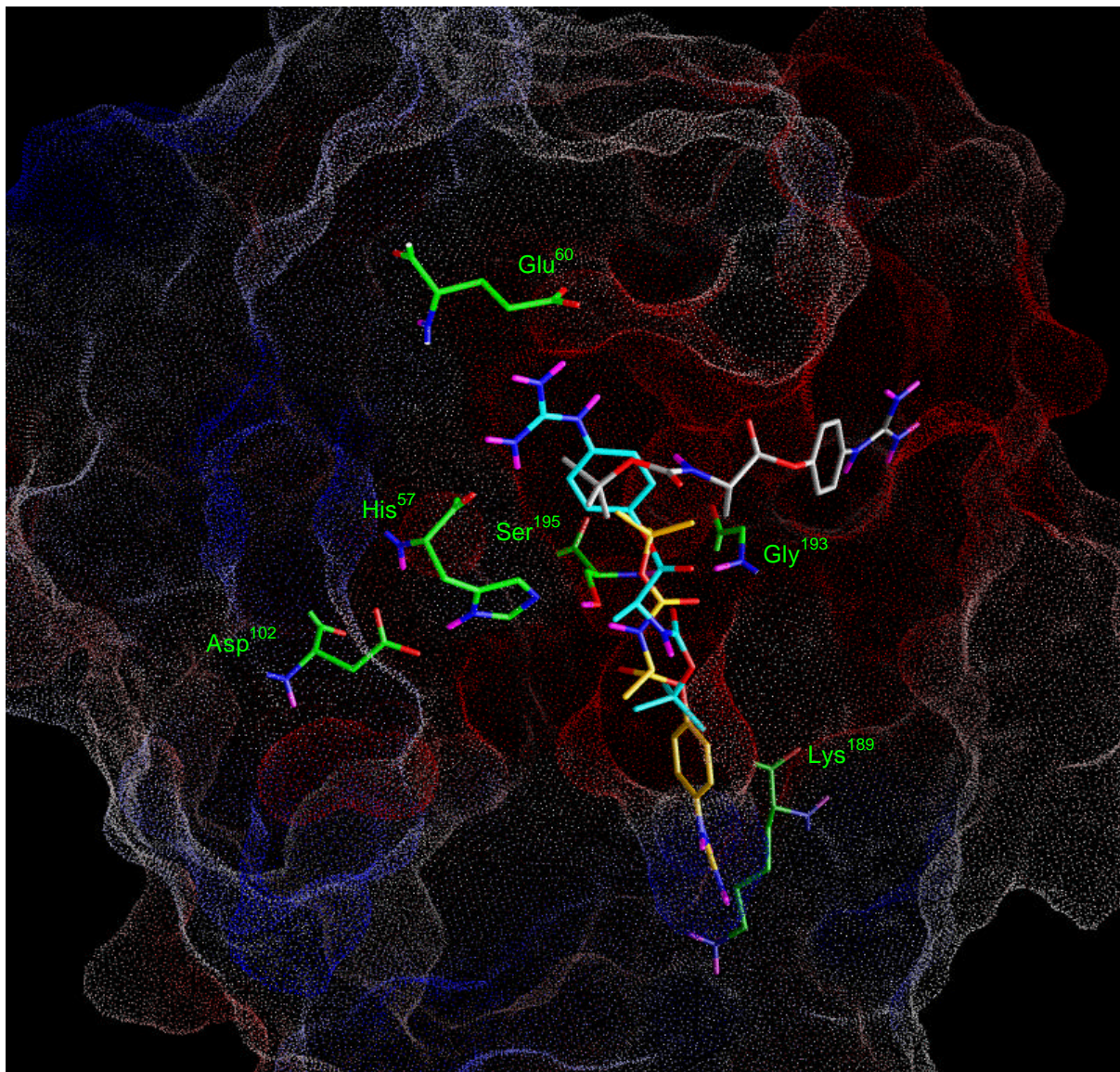


Abb. 17: Bindungskonformationen von Boc-L-Ala-OGp an *Trp D189K/K60E* berechnet durch AutoDock. (LEMKE, 2001)

gelber Ligand – Abgangsgruppe in S₁-Bindungstasche (Lys¹⁸⁹); blauer Ligand – Abgangsgruppe in S₁'-Bindungsregion (Glu⁶⁰); grauer Ligand – Bindung unproduktiv

Bei der Interpretation der von AutoDock berechneten Ergebnisse ist jedoch zu beachten, daß die Untersuchungen dynamische Prozesse wie beispielsweise „induced fit“- Vorgänge nicht wiedergeben können. Vernachlässigt wird weiterhin eine mögliche Flexibilität in der Struktur des Makromoleküls (hier Trypsin bzw. Trypsin-Varianten), da es während der Simulation als starr angenommen wird. Variiert wird nur die Lage des Liganden (Translation und Rotation) sowie dessen interne Torsionswinkel. Obgleich eine quantitative Korrelation zwischen den $\log k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werten der *wt Trypsin*-katalysierten Hydrolyse verschiedener Guanidinophenylester und den zugehörigen von AutoDock berechneten Bindungsenergien gefunden wurde [THORMANN et al., 1999], existieren Substrate, bei denen Theorie und Praxis zu unterschiedlichen Ergebnissen führten [GRÜNBERG, 1999]. Somit können die aus den Bindungsstudien für *Trp D189K/K60E* ermittelten Daten lediglich einen Hinweis auf die mögliche Ursache der erhöhten Spezifität von *Trp D189K/K60E* für die Guanidinophenylesterabgangsgruppe geben. Zu einer weiteren Aufklärung über die Art der OGp-vermittelten Substrateinbindung in *Trp D189K/K60E* wären Röntgenkristallstrukturanalysen prinzipiell geeignet. Jedoch ist es bislang nicht gelungen diese Trypsin-Variante zu kristallisieren.

Da die Abgangsgruppen-vermittelte Akzeptanz unspezifischer P_1 -Reste durch die Protease ein wesentliches Kriterium für die erfolgreiche Übertragung des Substratmimetika-Konzeptes darstellt, wurde in weiteren Hydrolyse-kinetischen Studien der Einfluß des P_1 -Restes innerhalb des Mimetikums auf die Spezifität des Katalysators untersucht. Hierfür kamen entsprechend der detektierten Präferenz der Variante *Trp D189K/K60E* für die basische Guanidinofunktion entsprechende Ester mit variabler P_1 -Aminosäure unter Einbeziehung beider Stereoisomere zum Einsatz (s. Tab. 14). Auffallend ist die signifikant ausgeprägte Spezifität der Dopplemutante für den Boc-Phe-OGp-Ester sowie für das längerkettige Mimetikum. Für letzteres ist der K_{M} -Wert im Vergleich mit den anderen Substraten der Tabelle 14, ausgenommen Boc-Phe-OGp, etwa um den Faktor 2 niedriger, während der k_{cat} -Wert um ca. 1 Größenordnung erhöht ist. Dieser Befund läßt sich damit erklären, daß umfangreichere Wechselwirkungen des längerkettigen Mimetikums mit dem Katalysator nicht nur zu einer verbesserten Einbindung des Substrates führen können, sondern vielmehr über eine gesteigerte Acylierungsrate (k_2) zu einer höheren katalytischen Effizienz [FERSHT et al., 1973; FERSHT, 1995].

Tab. 14: Kinetische Parameter der *Trp D189K/K60E*-katalysierten Hydrolyse Boc-geschützter L- bzw. D-Aminosäure- und Peptid-Guanidinophenylester.

Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
Boc-Gly-OGp	2,70	0,110	4,06 x 10 ¹
Boc-L-Ala-OGp	2,54	0,110	4,35 x 10 ¹
Boc-L-Gln-OGp	2,68	0,140	5,21 x 10 ¹
Boc-L-Leu-OGp	2,50	0,18	7,37 x 10 ¹
Boc-L-Phe-OGp	0,78	12,30	1,58 x 10 ⁴
Boc-D-Ala-OGp	2,98	0,091	3,06 x 10 ¹
Boc-D-Gln-OGp	2,83	0,096	3,28 x 10 ¹
Boc-D-Leu-OGp	3,02	0,100	3,41 x 10 ¹
Boc-D-Phe-OGp	2,84	0,097	3,42 x 10 ¹
Boc-Phe-Gly-Gly-OGp	1,33	1,730	1,30 x 10 ³

Bedingungen: 25 mM MOPS (pH 7,6), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 30 °C, 8% DMF, [Acyldonor]: 1/10 - 4 K_M , [*Trp D189K/K60E*]: 6,0 x 10⁻⁶ - 6,5 x 10⁻⁵ M, Fehler < 15%

Die signifikante Spezifität für den Boc-Phe-OGp-Ester wird maßgeblich bedingt durch einen um ca. 2 Größenordnungen höheren k_{cat} -Wert verglichen mit den übrigen Guanidinophenylestern der L-Serie aus Tabelle 14. Solche signifikanten Differenzen in den Hydrolyseraten verschiedener Boc-L-Xaa-OGp Substrate traten unter Verwendung des *wt Trypsins* nicht auf, wobei davon ausgegangen wurde, daß alle verwendeten OGp-Ester nach dem gleichen Prinzip gebunden und hydrolysiert werden [THORMANN et al., 1999]. Die signifikante Präferenz von *Trp D189K/K60E* für das Substrat Boc-L-Phe-OGp sollte demnach nicht Abgangsgruppen-vermittelt, sondern vielmehr durch das Vorhandensein des Phe-P₁-Restes bedingt sein. Entsprechend der Primärspezifität der Variante für aromatische P₁-Reste ist eine Substrateinpassung analog der konventioneller Estersubstrate mit der Phenylalaninseitenkette in die S₁-Bindungstasche denkbar. Diese Substrateinbindung könnte analog dem Trypsinogen erfolgen, in welchem die OGp-

Abgangsgruppe in Richtung der S₂'-Bindungsregion zeigt. Hierbei ergeben sich Wechselwirkungen zwischen basischer Guanidinophenylfunktion und dem sauren Rest Glu¹⁵¹ [ELSNER, 2000]. Ebenso wäre bei einer Einbindung der Phenylseitenkette in die primäre Bindungstasche eine Orientierung der basischen OGp-Abgangsgruppe zum entgegengesetzt geladenen Glu⁶⁰ in der S₁'-Bindungsregion denkbar. Als Folge einer gegenüber den anderen OGp-Substraten veränderten Einpassung von Boc-Phe-OGp in das aktive Zentrum der Trypsin-Variante sollte in diesem speziellen Fall die zu spaltende Esterbindung in Bezug auf die katalytische Triade besser positioniert sein, was eine nachfolgend schnellere Acylierung des Katalysator wahrscheinlich erscheinen läßt. Darüber hinaus würde bei der postulierten Substratbindung die Umlagerung des Acylrestes vom S'- in den S-Bindungsbereich des Katalysators entfallen, was sich wiederum auf die Hydrolyserate auswirkt, da die Deacylierung im Vergleich zu anderen Substratmimetika schneller erfolgen kann.

Interessanterweise ist auf Grund des kleineren K_M -Wertes die Substrataffinität der Doppelmutante für das Mimetikum Boc-Phe-OGp höher als die für den konventionellen Ac-Tyr-OMe-Ester. Gleichzeitig ist die Hydrolyserate von *Trp D189K/K60E* für Boc-Phe-OGp ca. 6fach höher als für Ac-Tyr-OMe, so daß in der Summe die Spezifitätskonstante für Boc-Phe-OGp um mehr als 1 Größenordnung über der für Ac-Tyr-OMe liegt. Zum einen können hierfür umfangreichere Wechselwirkungen des Mimetikums sowohl durch das P₁-Phe als auch durch die Abgangsgruppe verantwortlich gemacht werden. Zum anderen übt das OGp Substrat als schwach aktivierter Ester einen höheren Acylierungsdruck aus als die konventionelle OMe-Abgangsgruppe.

Weiterhin auffallend ist der Befund, daß alle anderen aufgeführten Substratmimetika der Tab. 14 einschließlich D-Stereoisomere für die Doppelmutante lediglich 1,5 Größenordnungen unspezifischer sind als der herkömmliche Ac-Tyr-OMe Ester. Im Fall des nativen Katalysators differieren die Spezifitätskonstanten zwischen den generell schlechter akzeptierten Substratmimetika und kommerziellem spezifischen Estersubstrat bis zu 3 Größenordnungen [THORMANN et al., 1999; ELSNER, 2000]. Während für *wt Trypsin* die D-Analoga entsprechender OGp Ester 1 bis 2 Größenordnungen unspezifischer sind [THORMANN et al., 1999], diskriminiert *Trp D189K/K60E* nur marginal zwischen OGp's mit L- bzw. korrespondierender D-Aminosäure in P₁-Position. Aus einem weiteren Vergleich geht hervor, daß im Fall des nativen Katalysators die Substrataffinität zwischen Boc-L-Xaa-OGp und

korrespondierendem D-Analoga um ca. 1 Größenordnung differieren [THORMANN et al., 1999] die für *Trp D189K/K60E* ermittelten K_M -Werte der Substratmimetika jedoch nahezu identisch sind (ausgenommen Boc-Phe-OGp). Die höhere Spezifität der nativen Protease für P_1 L-konfigurierte Guanidinophenylester basiert maßgeblich auf der schnelleren Umlagerung (K_R) des Acylrestes in den S-Bindungsbereich des Katalysators. Somit erhöht sich die Hydrolyserate bedingt durch eine schnellere Deacylierung k_3 , welche in den *wt Trypsin*-katalysierten Hydrolysen der Guanidinophenylester den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt [SEKIZAKI et al., 1996; THORMANN et al., 1999]. Die lediglich marginal differierenden k_{cat} -Werte in den *Trp D189K/K60E*-katalysierten Hydrolysen der P_1 L- bzw. D- konfigurierten Substratmimetika deuten auf einen geringen Einfluß der Deacylierung auf die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion hin. Somit sollte bedingt durch einen generellen Defekt der Trypsin-Variante im Acylierungsschritt die Hydrolyserate der Guanidinophenylester maßgeblich durch k_2 bestimmt werden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß in Bezug auf die Doppelmutante jeder der verwendeten Boc-L/D-Xaa-OGp Ester eine höhere Spezifität aufweist als das Peptid AAYAG, welches mit Tyr eine sensitive Spaltstelle beinhaltet. Demzufolge sollten *Trp D189K/K60E*-katalysierte Synthesereaktionen trotz einer sensitiven Spaltstelle innerhalb des Nukleophils sogar unter Verwendung N^{α} -geschützter D-Aminosäure-Guanidinophenylester erfolgreich verlaufen. Derartige Reaktionen waren bislang unter Verwendung der nativen Protease praktisch unmöglich, da die Spezifitätskonstanten für Boc-D-Xaa-OGp (Xaa= D-Ala, D-Leu, D-Gln) Ester bezogen auf spezifische Peptidsubstrate 1 bis 2 Größenordnungen niedriger sind [THORMANN et al., 1999]. Im Fall der L-Stereoisomere entsprechender OGp's sind die Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M bezogen auf Arginin- bzw. Lysin-enthaltende Peptide entweder ähnlich oder sogar niedriger, so daß derartige *wt-Trypsin*-katalysierte Reaktionen zu relativ geringen Ausbeuten führen (vgl. Tab. 2). Durch die Mutation D189E ist es zwar gelungen die synthetischen Eigenschaften ausgehend von der nativen Protease zu verbessern, jedoch ist auch *Trp D189E* für die Substratmimetika-vermittelte Knüpfung von D-Aminosäuren auf Peptide mit sensitiven Spaltstellen nicht geeignet [XU et al., 2001]. Dem entgegen sollten solche Synthesereaktionen unter der Katalyse von *Trp D189K/K60E* auf Grund der ermittelten Daten prinzipiell möglich sein, was es im nächsten Abschnitt näher zu untersuchen galt.

3.3.2. Einfluß des P₁-Restes in Substratmimetika-vermittelten Acyltransferreaktionen

In weiterführenden Modellreaktionen wurde der Einfluß des P₁-Restes innerhalb des Substratmimetikums auf den Verlauf von *Trp D189K/K60E*-katalysierten Synthesereaktionen untersucht. Als Acyldonor kamen die in Tabelle 15 bzw. 16 aufgeführten OGP Ester codierter sowie nicht codierter Amino- bzw. Carbonsäuren zum Einsatz, wobei als Acylakzeptoren die bereits in vorangegangenen Acyltransferexperimenten verwendeten Pentapeptide fungierten. Die erhaltenen Ergebnisse belegen, daß der Erfolg Substratmimetika-vermittelter *Trp D189K/K60E*-katalysierter Synthesen nicht zwangsläufig von einer bestimmten Aminosäuren in P₁ Position des Substrates abhängig ist, wenngleich die Produktausbeuten der durchgeführten Synthesereaktionen variieren. Auffallend sind die mit über 90% Produktausbeute hoch effizienten Knüpfungen unter Verwendung von Bz-Gly-OGP bzw. Boc-Phe-Gly-Gly-OGP, in denen der P₁-Rest mit einem Glycin besetzt ist (s. Tab. 15). Auf Grund des signifikant verbesserten Verhältnisses zwischen Esterase- und Amidaseaktivität der Variante *Trp D189K/K60E* sind unter Verwendung dieses neuartigen Katalysators im Gegensatz zum *wt-Trypsin* trotz sensitiver Spaltstellen im Acylakzeptor Substratmimetika-vermittelte Verknüpfungen von nichtcodierten Amino- bzw.- Carbonsäuren möglich. Aus den Ergebnissen der Tabelle 16, die bis auf Bz-β-Ala-OGP eine hoch effiziente Peptidsynthese durch *Trp D189K/K60E* dokumentieren, kann angenommen werden, daß neben den Bz-D-Xaa-OGP's selbst Pbu-OGP produktiv über die basische Abgangsgruppe an den Katalysator gebunden wird und das Serin 195 mit dem Phenylbuttersäurerest acyliert wird. Bereits unter den *Chymotrypsin*-katalysierten, Substratmimetika-vermittelten Synthesereaktionen erbrachte der Acyltransfer unter Verwendung von Pbu-OGP sehr hohe Produktausbeuten [GÜNTHER, 1998]. Bemerkenswerter Weise wird das durch Bz-β-Alanin acylierte *Trp D189K/K60E*, das dem durch Phenylbuttersäure acylierten Katalysator strukturell sehr ähnlich ist nur mit geringer Effizienz von den verwendeten Nukleophilen deacyliert. Dies korreliert wiederum mit den Ergebnissen von Günther, die den gleichen Effekt auch für Chymotrypsin dokumentierte [GÜNTHER, 1998]. Auf Grund der meist hohen Produktausbeuten der durchgeführten Synthesereaktionen kann angenommen werden, daß die Veränderungen im aktiven Zentrum der Protease offensichtlich die Effektivität des Enzyms in Bezug auf eine Peptidbindungsknüpfung nicht wesentlich verändern, was bereits unter Verwendung von *Trp D189S* gezeigt werden konnte [GRÜNBERG et al., 2000].

Ein Produktabbau durch kompetitive Spaltungsreaktionen nach „sensitiven“ Acylresten während der Synthesereaktionen kann mit <3% als marginal eingestuft werden.

Tab. 15: Substratmimetika-vermittelte *Trp* *D189K/K60E*-katalysierte Acyltransferreaktionen codierter Aminosäuren auf Pentapeptide

Acyldonor	Acylakzeptor	Produktausbeute [%]
Bz-Gly-OGp	AAKAG	97,3
	AARAG	98,0
	AAFAG	95,9
	AA YAG	92,4
Bz-Ala-OGp	AAKAG	67,6
	AARAG	69,3
	AAFAG	65,2
	AA YAG	68,5
Bz-Leu-OGp	AAKAG	80,1
	AARAG	86,0
	AAFAG	75,6
	AA YAG	75,2
Bz-Phe-OGp	AAKAG	72,2
	AARAG	76,8
	AAFAG	67,3
	AA YAG	70,8
Boc-Phe-Gly-Gly-OGp	AAKAG	93,7
	AARAG	94,3
	AAFAG	92,8
	AA YAG	95,3

Bedingungen: 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8, 30°C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D189K/K60E*]: $6,5 \times 10^{-6}$ - $1,3 \times 10^{-5}$ M

Tab. 16: Substratmimetika-vermittelte *Trp D189K/K60E*-katalysierte Acyltransferreaktionen von nichtcodierten Amino- bzw. Carbonsäuren auf Pentapeptide.

Acyldonor	Acylakzeptor	Produktausbeute [%]
Bz-D-Ala-OGp	AAKAG	64,7
	AARAG	66,2
	AAFAG	56,5
	AA YAG	66,3
Bz-D-Leu-OGp	AAKAG	81,4
	AARAG	88,1
	AAFAG	75,7
	AA YAG	75,4
Bz-D-Phe-OGp	AAKAG	77,2
	AARAG	80,4
	AAFAG	67,0
	AA YAG	71,5
Bz-β-Ala-OGp	AAKAG	25,9
	AARAG	28,4
	AAFAG	21,3
	AA YAG	22,8
Pbu-OGp	AAKAG	62,5
	AARAG	64,6
	AAFAG	52,7
	AA YAG	54,3

Bedingungen: 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8, 30°C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM, [Acylakzeptor]: 15 mM, [*Trp D189K/K60E*]: $6,5 \times 10^{-6}$ - $1,3 \times 10^{-5}$ M

Somit belegen die erhaltenen Ergebnisse, daß unter Verwendung des Substratmimetika-Konzeptes *Trp D189K/K60E* auch durch natürlicherweise unspezifische Aminosäuren und sogar nichtaminosäureartige Carbonsäuren acyliert und nachfolgend eine effiziente Verknüpfung mit geeigneten Acylakzeptoren erfolgen kann.

3.3.3. Einfluß der S_1' -Spezifität von *Trp D189K/K60E* auf die Acyltransfereneffizienz

Zur Charakterisierung der S_1' -Spezifität von *Trp D189K/K60E* und im Vergleich dazu *Trp D189K*, *wt Trypsin*, *Trp K60E* wurden $1/p$ -Werte auf der Basis der Partitionskonstanten bestimmt (s. Abb. 18). Die routinemäßig in derartigen Acyltransferreaktionen verwendeten kommerziellen Estersubstrate wurden dabei der jeweiligen Primärspezifität des Katalysators gerecht. So kam für *Trp D189K/K60E* sowie *Trp D189K* ein Ac-Tyr-OMe-Ester zum Einsatz während die Acylierung von *wt Trypsin* bzw. *Trp K60E* durch Bz-Arg-OEt erfolgte. Auf Seiten des Acylakzeptors sind mit den eingesetzten Aminosäureamiden der allgemeinen Form $H-Xaa-NH_2$ verschiedene Strukturklassen innerhalb der Aminosäuren repräsentativ vertreten. Entgegen der nativen Protease und *Trp D189K*, die in S_1' -Position des Substrates hydrophobe, aliphatische und aromatische Aminosäuren (Met, Leu, Phe) bevorzugt binden, zeichnet sich *Trp D189K/K60E* durch eine signifikante Präferenz für basische

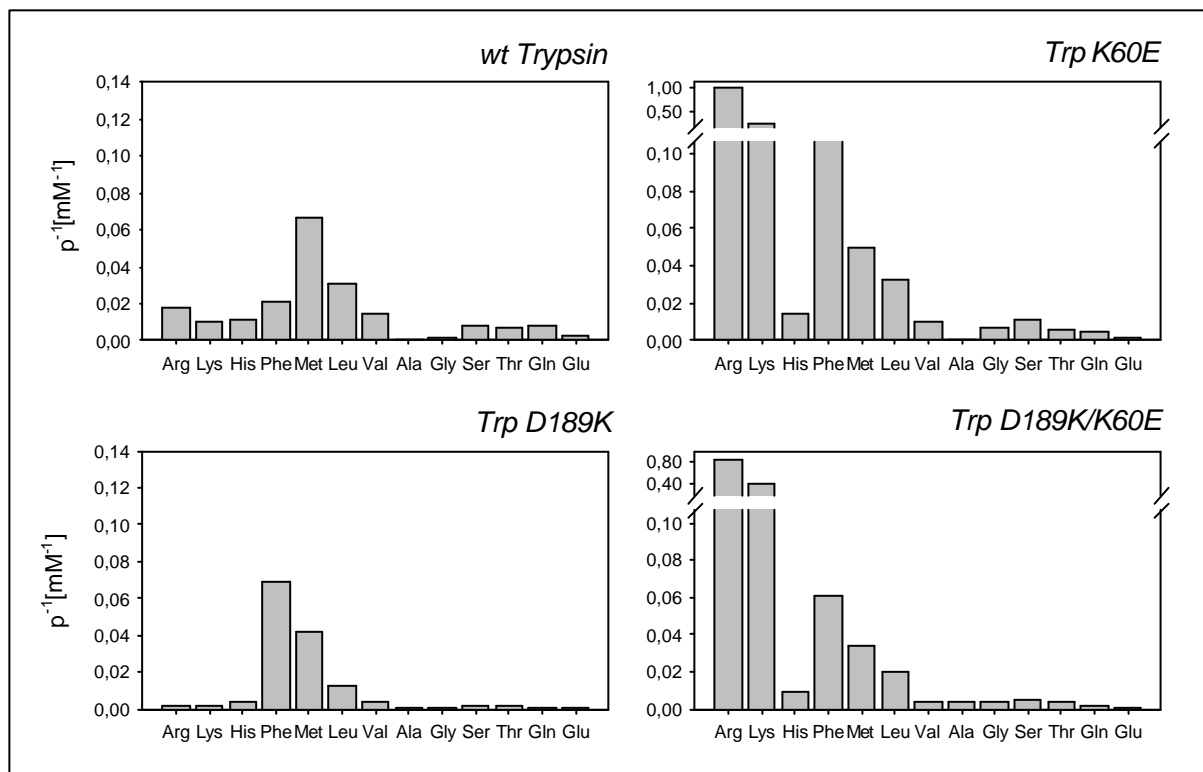


Abb. 18: S_1' -Spezifität von *Trp D189K/K60E* im Vergleich zu *Trp D189K*, *wt Trypsin* und *Trp K60E*. $1/p$ -Werte der Acyltransferreaktionen von Bz-Arg-OEt (*wt Trypsin*, *Trp K60E*) bzw. Ac-Tyr-OEt (*Trp D189K*, *Trp D189K/K60E*) auf Aminosäureamid-Nukleophile der Struktur $H-Xaa-NH_2$ Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH8), 0,1 M NaCl, 0,01 M $CaCl_2$, [Ester]: 2 mM, [Nukleophil]: 15 mM, 30 °C

Reste (speziell Arginin) in P_1' aus. Die signifikante Zunahme der S_1' -Spezifität der Doppelmutante für Arginin ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Salzbrücke zwischen dem P_1' -Arg des Substrates und dem Glu⁶⁰ des Katalysators zurückzuführen, wie sie bereits im *Trp K60E* mit Hilfe von Molekülmodellierungsstudien visualisiert werden konnte [GOODSELL et al., 1996; MORRIS et al., 1996; KURTH, 1998]. Auffallend ist die Tatsache, daß sich die Spezifitätsprofile des S_1' -Bindungsortes von *Trp K60E* und *Trp D189K/K60E* in signifikanter Weise ähneln. Dabei induziert der Austausch K60E im Vergleich von *Trp D189K* und *Trp D189K/K60E* bzw. *wt-Trypsin* und *Trp K60E* eine Erhöhung der Nukleophileffizienz um ca. 1 Größenordnung bezogen auf die jeweils spezifischsten Nukleophile. Die S_1' -Spezifität von *Trp D189K/K60E* gegenüber kleinen ungeladenen bzw. negativ geladenen Resten ist gering und ähnlich dem nativen Katalysator. Lediglich Prolin wird von *Trp D189K/K60E* und allen weiteren getesteten Katalysatoren vermutlich aus sterischen Gründen in der S_1' -Bindungsregion nicht produktiv gebunden. Die relativ gute Akzeptanz hydrophober P_1' -Reste ist wahrscheinlich auf den überwiegend hydrophoben Charakter des aktiven Zentrums, analog dem Wildtyp und *Trp D189K*, zurückzuführen.

Die dargelegten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß *Trp D189K/K60E* katalysierte Synthesereaktionen auf Nukleophile mit einer N-terminalen basischen Aminosäure, insbesondere Arginin, auch unter Verwendung von Substratmimetika hoch effizient verlaufen sollten. Bestätigt wird diese Annahme durch die in Abb. 19 zusammengefaßten Ergebnisse. Tendenziell verlaufen die Substratmimetika-vermittelten Knüpfungen auf H-Arg-NH₂ am effizientesten obgleich auch unter Verwendung schlechter akzeptierter Nukleophile Ausbeuten über 40% erreicht wurden. Bemerkenswerterweise führt der Acyltransfer unter Verwendung des Bz-Pro-OGp Esters analog den *Trp D189S* bzw. *Chymotrypsin*-katalysierten Synthesen unabhängig vom Acylakzeptor zu sehr hohen Ausbeuten [GRÜNBERG et al., 2000; GÜNTHER et al., 2000]. Darüber hinaus ist unter Anwendung des Substratmimetika-Konzeptes eine Acylierung des Trypsin durch einen natürlicherweise unspezifischen sauren P_1 -Rest in Bz-Glu-OGp möglich.

Mit der erfolgreichen Übertragung des Substratmimetika-Konzeptes auf *Trp D189K/K60E* sollte nun das synthetische Potential dieses neuen Katalysators in Segmentkondensationen sowie der N-terminalen Modifizierung von Peptiden bzw. Proteinen beispielhaft demonstriert werden.

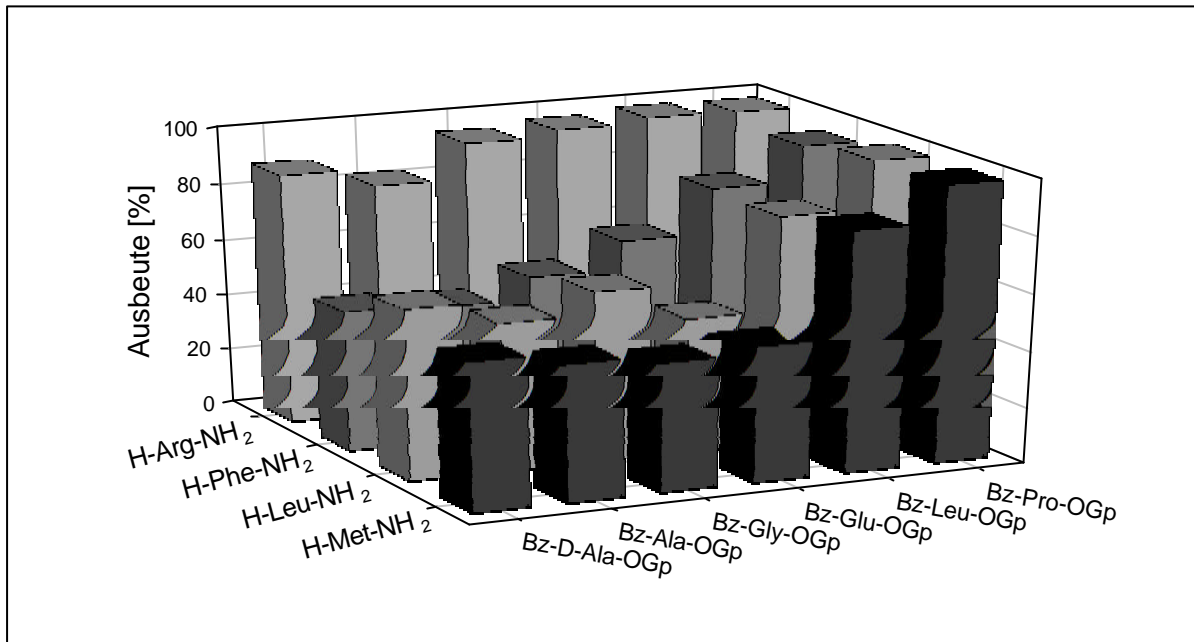


Abb. 19: Einfluß der Aminosäure in P₁'-Position auf die Effizienz des *Trp D189K/K60E*-katalysierten Substratmimetika-vermittelten Acyltransfer

Bedingungen: 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, pH 8, 30°C, 8% DMF, [Acyldonor]: 2 mM. [Acylakzeptor]: 15 mM. [*Trp D189K/K60E*]: 6.5×10^{-6} - 1.3×10^{-5} M

3.4. Anwendung von *Trp D189K/K60E* in Segmentligationen und der selektiv *N*-terminalen Modifizierung von Peptiden und Proteinen

3.4.1. Substratmimetika-vermittelte Segmentligationen

Insbesondere für die Synthese längerer Peptide hat sich die enzymatische Verknüpfung chemisch aufgebauter Peptidsegmente bewährt [vgl. JACKSON et al., 1994; CEROVSKY et al., 2000]. In Kombination mit der Substratmimetika-Strategie können auf semisynthetischem Weg größere Peptide unabhängig von der primären Spezifität des Katalysators hergestellt werden [CEROVSKY et al., 2000; WEHOFSKY, 2000]. In nachfolgenden Segmentkondensationen sollte das synthetische Potential der Variante *Trp D189K/K60E* unter Beweis gestellt werden. Hierzu wurden zunächst zwei Modellreaktionen ausgewählt (s. Abb. 20). Dabei entspricht das aus der 8 + 16 Kondensationen resultierende 24er Peptid ohne Boc-Schutzgruppe der Sequenz 493-515 des humanen thyroiden PKA (Proteinkinase A) Ankerproteins, das auch als Ht31-Peptid bezeichnet wird. Durch CEROVSKY et al. erfolgte bereits unter der

Katalyse von Chymotrypsin die Herstellung dieses Peptides, wobei bei zweifachem Überschuß des Acyldonors ein praktisch quantitativer Umsatz des Acylakzeptors und somit eine Ausbeute von 95% detektiert werden konnte [CEROVSKY et al., 2000].

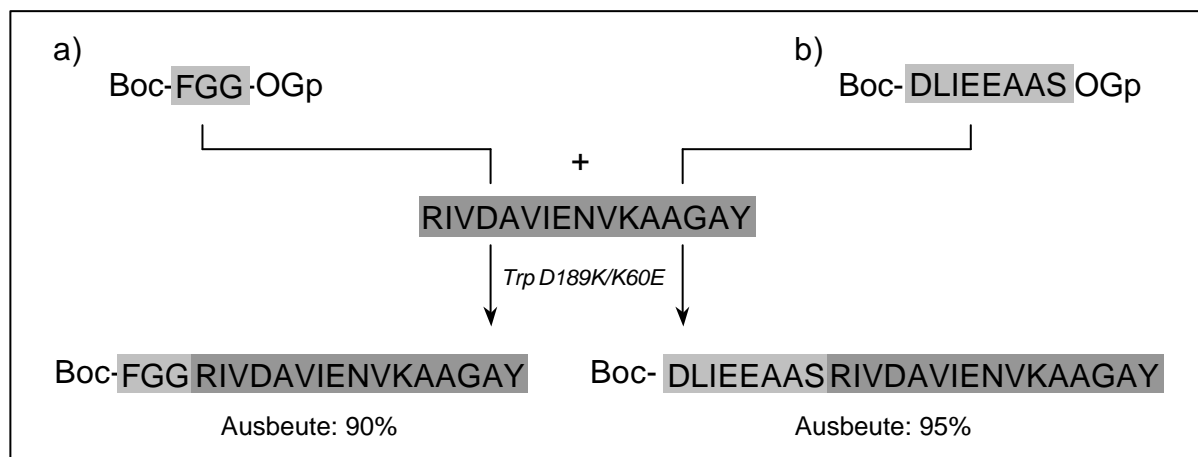


Abb. 20: Syntheschema der *Trp D189K/K60E*-katalysierten Segmentkondensation von Boc-FGG-OGp bzw. Boc-DLIEEAAS-OGp mit RIVDAVIENVKAAGAY.

Bedingungen: a) 0,1 M HEPES (pH 8,0); 0,1 M NaCl; 0,01 M CaCl₂; 8% DMF; [Acyldonor]: 4 mM; [Acylakzeptor]: 6 mM; [*Trp D189K/K60E*]: 5,0 x 10⁻⁶ M; 30 °C;
 b) 0,12 M Veronal-Puffer (pH 8,5); 39% DMSO; [Acyldonor]: 12,5 mM; [Acylakzeptor]: 6,25 mM; [*Trp D189K/K60E*]: 5,0 x 10⁻⁶ M; 30 °C

Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde das somit sequenzgetreue Ht31 Peptid in biologischen Assays zur Untersuchung der PKA-abhängigen Regulation von Ionenkanälen in Säugetier-Herzzellen eingesetzt [CEROVSKY et al., 2000; KOCKSKÄMPER et al., 2001]. Unter der Katalyse von *Trp D189K/K60E* konnte mit einer Ausbeute von 95% ein fast quantitativer Umsatz des Acyldonors detektiert werden (in Zusammenarbeit mit Dr. Vaclav Cerovsky). Eine ebenso effiziente Synthese mit einer Produktausbeute von 90% erfolgte unter Verwendung des gleichen Acylakzeptors und des kürzeren Boc-FGG-OGp-Esters. Die Stabilität der Syntheseprodukte wurde über einen Zeitraum von 4 Stunden verfolgt, wobei keine proteolytische Spaltung der Peptidprodukte auftrat. Der synthetische Nutzen der Variante *Trp D189K/K60E* wird nochmals durch die Tatsache unterstrichen, daß beide vorgestellten Modellreaktionen unter Verwendung des nativen Katalysators auf Grund sensitiver Spaltstellen innerhalb des verwendeten Acylakzeptors bzw. des Ligationsproduktes nicht möglich sind.

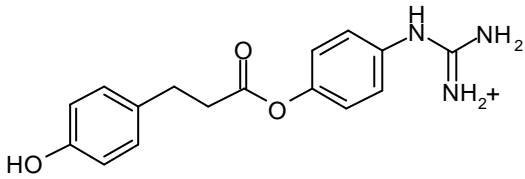
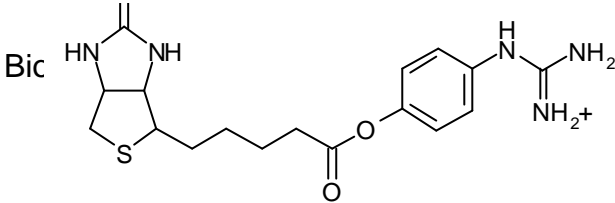
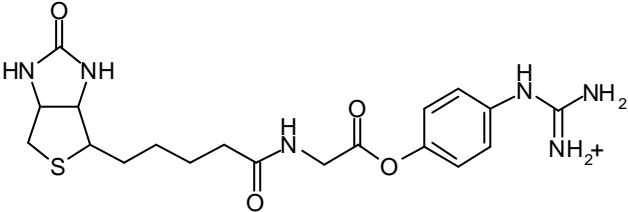
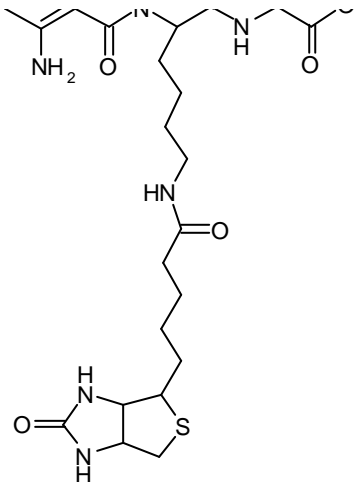
3.4.2. Selektiv *N*-terminale Modifizierungen von Peptiden und Proteinen

Da chemische Modifizierungen von natürlich vorkommenden oder gentechnisch hergestellten Peptiden bzw. Proteinen unter Verwendung hoch reaktiver Markierungsreagenzien in der Regel nicht zu einer selektiven Markierung der Targets führen, stellen Enzyme auf Grund ihrer hohen Regio- und Stereospezifität sowie Selektivität für die zu katalysierende Reaktion eine interessante Alternative dar. Zwar ist die Einführung von Reportergruppen in chemisch aufgebaute Peptide im Zuge der Synthese prinzipiell möglich [ROTHBARD et al., 1989; CHERSI et al., 1990, 1997, 2000], aber auf Grund der bereits in der Einleitung erwähnten Problempunkte dieser Synthesestrategie nicht immer zu realisieren. Des weiteren ist zu gewährleisten, daß entsprechende Markergruppierungen gegenüber den verwendeten Kupplungs- und Deblockierungsmitteln stabil sind, was ein zusätzliches Hindernis im Rahmen der chemischen Synthese darstellen kann.

Die prinzipielle Anwendbarkeit des Substratmimetika-Konzeptes zur selektiven *N*-terminalen Einführung von Reporter- und Schutzgruppen in Peptide konnte bereits von WEHOFSKY unter Verwendung von nativem Trypsin, Chymotrypsin sowie der V8 Protease gezeigt werden [WEHOFSKY, 2000]. So erfolgten Modifizierungen verschiedener Peptide, die jedoch keine sensitiven Spaltstellen enthielten, in allen Reaktionen hoch effizient. Es galt nun zu untersuchen, wie effektiv *Trp D189K/K60E*-katalysierte, Substratmimetika-vermittelte Modifizierungen von Peptiden und Proteinen verlaufen. Die hierfür verwendeten Guanidinophenylester-Derivate, welche Fluoreszenzmarker bzw. den Biotin-Rest beinhalten, sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die ausgewählten Fluoreszenzmarker gewährleisteten eine sehr sensitive Detektionsmöglichkeit der modifizierten Targets. Das Einführen eines Biotin-Labels in Peptide oder Proteine ermöglicht eine Isolierung modifizierter Moleküle aus einem Stoffgemisch mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von Avidin. Die exogene Biotinylierung von Peptiden und Proteinen hat sich in den letzten Jahrzehnten, nicht zuletzt auf Grund der bekannten guten Wechselwirkung mit Avidin, als eine effiziente Technik für molekularbiologische und biomedizinische Anwendungen, speziell bei der Untersuchung von Geweben oder komplexen Lösungen entwickelt [vgl. Reviews von WILCHEK & BAYER, 1988, 1990]. Dem zugrunde liegt die hohe Affinität des Biotins für die Bindung an Avidin bzw. Streptavidin [GREEN, 1975]. Die Dissoziationskonstante des Biotin- Avidin-Komplexes

ist mit einem Wert von 10^{-15} M eine der niedrigsten überhaupt. Diese hoch affine Bindung ergibt sich aus einer sehr stabilen nicht-kovalenten Wechselwirkung beider Partner. Im Gegensatz hierzu beträgt die Dissoziationskonstante des Komplexes

Tab. 17: Substratmimetika für die N-terminale Modifizierung von Peptiden und Proteinen.

Substratmimetikum	Struktur
I	
Bic	
	
	

Biotin-monomeres Avidin lediglich 10^{-8} M, was jedoch eine Elution biotinylierter Moleküle mit freiem Biotin ermöglicht [HENRICKSON et al., 1979]. Die Technik des monomeren Avidins wurde bereits seit Mitte der 1970er Jahre erfolgreich praktiziert [GREEN et al., 1973, GUHAIT et al., 1974, HENRICKSON et al., 1979]. Dabei hatte sich gezeigt, daß für eine erfolgreiche Bindung des modifizierten Moleküls das angeknüpfte Biotin in Bezug auf den Bindungspartner Avidin möglichst gut zugänglich sein sollte. Unter Berücksichtigung dieses Befundes wurden in eigenen Markierungsreaktionen verschiedene Substratmimetika verwendet, bei denen der Abstand von der Biotinyl-Gruppe zum *N*-Terminus des zu modifizierenden Targets von Bio-OGp über Bio-Gly-OGp zu Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp schrittweise zunimmt. Letztgenanntes Derivat beinhaltet neben dem Biotin-Label aus Gründen einer sensitiveren Analytik zusätzlich einen Fluoreszenzmarker.

Die Ergebnisse in Tabelle 18 verdeutlichen, daß der Glycin-Rest zwischen Biotin-Label und OGp-Abgangsgruppe im Vergleich der beiden Ester Bio-OGp und Bio-Gly-OGp einen Ausbeute-steigernden Effekt (ca. 10%) besitzt. Dabei führt der Einsatz höherer Konzentrationen an Acyldonor generell zu einer Erhöhung der Produktausbeute.

Tab. 18: *Trp D189K/K60E*-katalysierte Substratmimetika-vermittelte *N*-terminale Modifizierungen von RIVDAVIENVKAAGAY.

Acyldonor		Acylakzeptor	Produkt [%]
Phloretyl-OGp	a)	RIVDAVIENVKAAGAY	55,8
	b)		67,3
Biotinyl-OGp	a)	RIVDAVIENVKAAGAY	60,5
	b)		69,9
Biotinyl-Gly-OGp	a)	RIVDAVIENVKAAGAY	76,4
	b)		94,5
Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp	a)	RIVDAVIENVKAAGAY	74,9
	b)		90,3

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0); 0,1 M NaCl; 0,01 M CaCl₂; 8% DMF; [Acyldonor] a)= 4 mM b)= 8 mM; [Acylakzeptor]: 2 mM; 30 °C; [*Trp D189K/K60E*]: $5,0 \times 10^{-6}$ – $4,8 \times 10^{-5}$ M

Die Modifizierung der ausgewählten Peptide erfolgte *Trp D189K/K60E*-katalysiert unter Verwendung der Ester Bio-OGp bzw. Phloretyl-OGp zwar mit geringerer Effizienz als unter Verwendung des nativen Katalysators [WEHOFSKY, 2000], jedoch liegen die Ausbeuten mit über 55% Produkt in akzeptablen Bereichen. Darüber hinaus stellt die Doppelmutante auf Grund der marginalen Amidaseaktivität im Gegensatz zum *wt-Trypsin* mit Hinblick auf proteolytische Nebenreaktionen keine besonderen Anforderungen an die Sequenz der zu modifizierenden Targets.

Nachdem die vorangegangenen Experimente die prinzipielle Anwendbarkeit der Variante *Trp D189K/K60E* für *N*-terminale Modifizierungsreaktionen veranschaulichen konnten, galt es in weiterführenden Versuchen Reportergruppen in länger-kettige Targets einzuführen. Als Zielproteine hierfür wurden ein rekombinantes Insulin, Ribonuklease A sowie das *E.coli* Parvulin 10 ausgewählt. Als Acyldonor diente auf Grund der bereits erwähnten guten Detektionsmöglichkeit bzw. der Biotin-Gruppe vorzugsweise das Substratmimetikum Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp.

Während der experimentellen Arbeiten zur Modifizierung des rekombinanten Insulins (R-Insulin) hatte sich bestätigt, daß durch sequentielle Zugabe des Acyldonors wie erwartet die Syntheseausbeute erhöht werden kann. Für diese Vorgehensweise wurde die Enzymkonzentration so gewählt, daß nach 5 Minuten im Reaktionsgemisch kein Ester mehr nachzuweisen war. Erst danach wurde dem Reaktionsansatz erneut Acyldonor zugegeben. Durch Kontrollversuche konnte eine spontane Acylierung des Targets durch das Substratmimetikum unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen werden. Auch ein proteolytischer Abbau des Insulins durch *Trp D189K/K60E* wurde nicht beobachtet. Ein Syntheschema der Markierungsreaktion ist in Abb. 21 dargestellt, wobei von einer selektiv *N*-terminalen Modifizierung der A-Kette des R-Insulins durch die Trypsin-Variante ausgegangen wurde. Durch 5malige Zugabe des Acyldonors Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp konnte für die Markierung von R-Insulin HPLC-analytisch eine Produktausbeute von 25%, aus der Abnahme des Peakflächenintegrals des unmodifizierten Targets (280 nm) und des verwendeten Substratmimetikums (320 nm) ermittelt werden. Das markierte Protein ließ sich unter Verwendung eines geeigneten Gradienten mittels HPLC gut vom nicht markierten Insulin abtrennen (s. Abb. 22). Beide Insulin-Fractionen wurden aufgefangen und die Molekulargewichte mittels Massenspektrometrie bestimmt (s. Abb. 23).

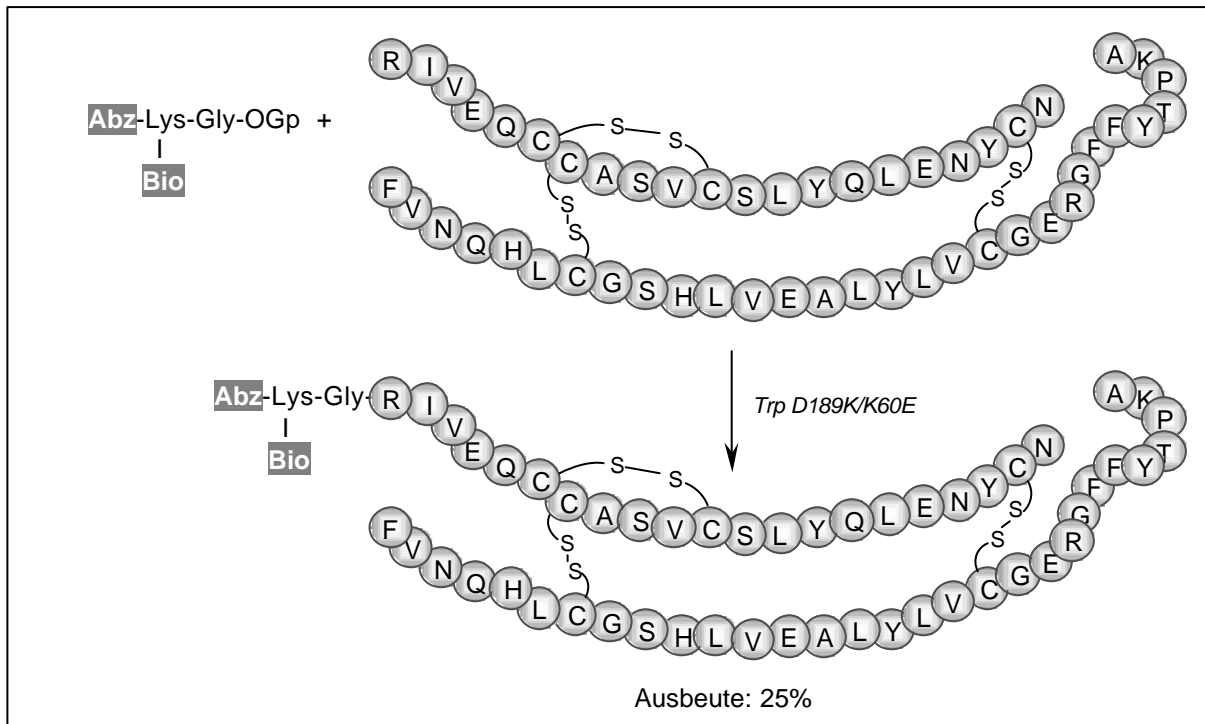


Abb. 21: Syntheschema der *Trp D189K/K60E*-katalysierten *N*-terminalen Modifizierung der A-Kette von rekombinantem Insulin.

Bedingungen: 0,1 M HEPES (pH 8,0) , 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂, 2-9,3% DMF, 30 °C, [Acyldonor]:5 x 4 mM, [Acylakzeptor]: 1 mM, [*Trp D189K/K60E*]: 8,0 x 10⁻⁵ M

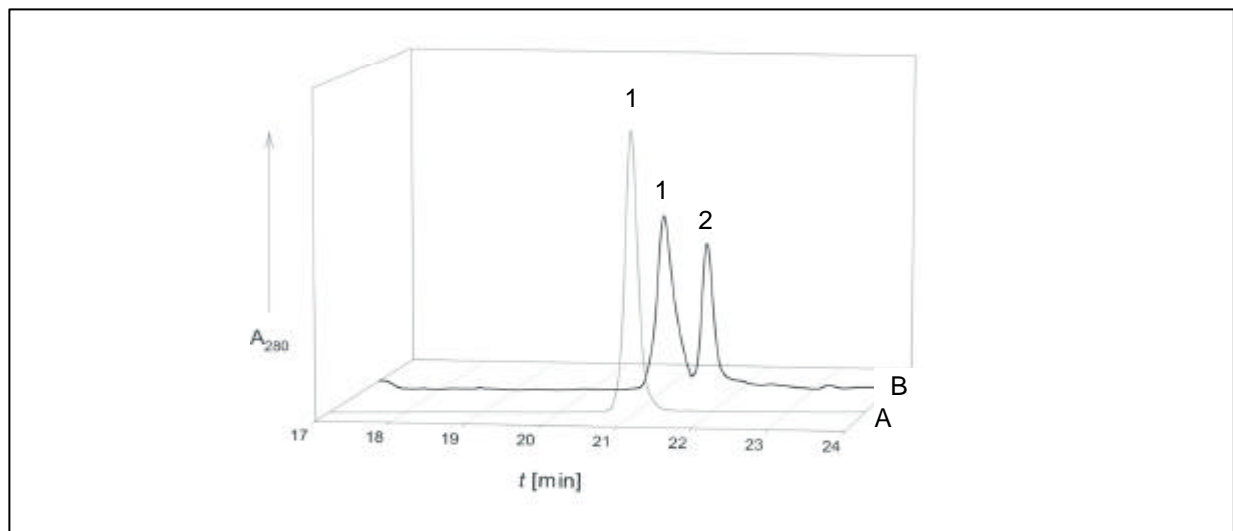


Abb. 22: HPLC-Profile der *Trp D189K/K60E*-katalysierten *N*-terminalen Modifizierung von rekombinantem Insulin mit Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp. A: Syntheseansatz vor Enzymzugabe, B: Syntheseansatz nach 25 min; (1) natives R-Insulin, (2) Abz-Lys(Bio)Gly-R-Insulin

Bedingungen: s. Abb. 21

Anhand der MALDI-TOF Analysen konnte sichergestellt werden, daß ausschließlich eine Substratmimetika-vermittelte Einfachmarkierung des rekombinanten Insulins durch *Trp D189K/K60E* erfolgte. Dabei wurde im Massenspektrum anhand einer Kettentrennung deutlich, daß sich die Modifizierung ausschließlich auf die A-Kette des Insulins beschränkt und die B-Kette in nativem Zustand vorliegt.

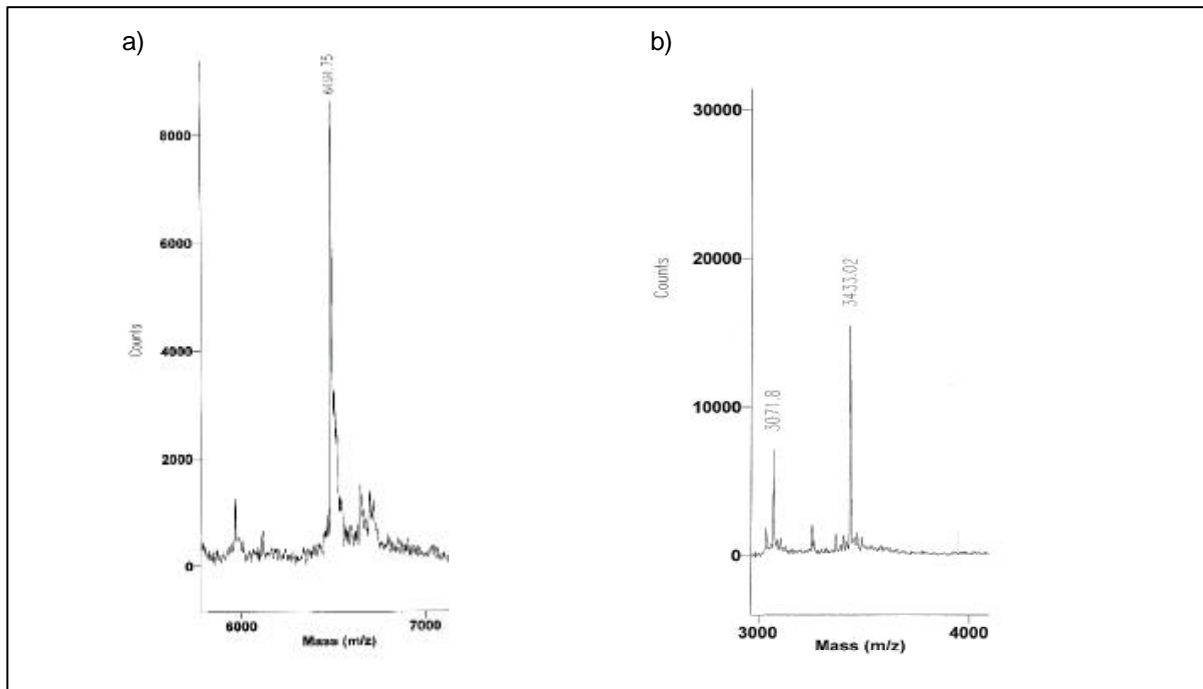


Abb. 23: a) MALDI-TOF-Massenspektrum von Abz-Lys(Bio)-Gly-R-Insulin (6494,75 D, MW ber.:6493,8 D), Fraktion nach Aufreinigung mit HPLC bzw. der modifizierten A-Kette (3071,8 D, MW ber.: 3069,7 D) und nativer B-Kette (3433,02 D, MW ber.: 3430 D).

In einem analogen Reaktionsansatz unter 5maliger Zugabe des Acyldonors Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp wurde die *Trp D189K/K60E*-katalysierte Modifizierung von RNase A durchgeführt. Hierbei erfolgte die Isolierung der markierten RNase A aus dem Reaktionsansatz mit Hilfe einer Affinitätschromatographie unter Verwendung von monomerem Avidin wie unter 5.6.2. beschrieben. Die Abbildung 24 zeigt ein Elutionsprofil der Avidin-Säule, aus dem eine erfolgreiche Bindung biotinylierter RNase A Moleküle hervorgeht. Für eine Bestimmung der Proteinspezies innerhalb der einzelnen Fraktionen wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß die ersten Fraktionen nach dem Auftragen der Probe ausschließlich das unmodifizierte Target enthielten, während modifizierte

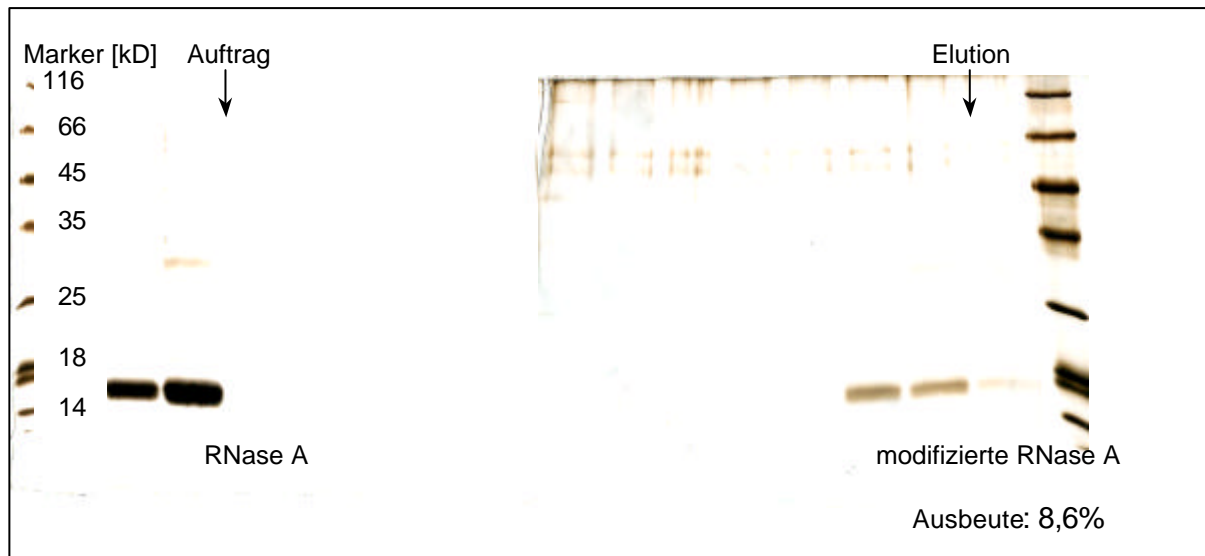


Abb. 24: SDS-Gele, Fraktionen aus der Präparation der modifizierten RNase A nach Affinitätschromatographie an monomerem Avidin.

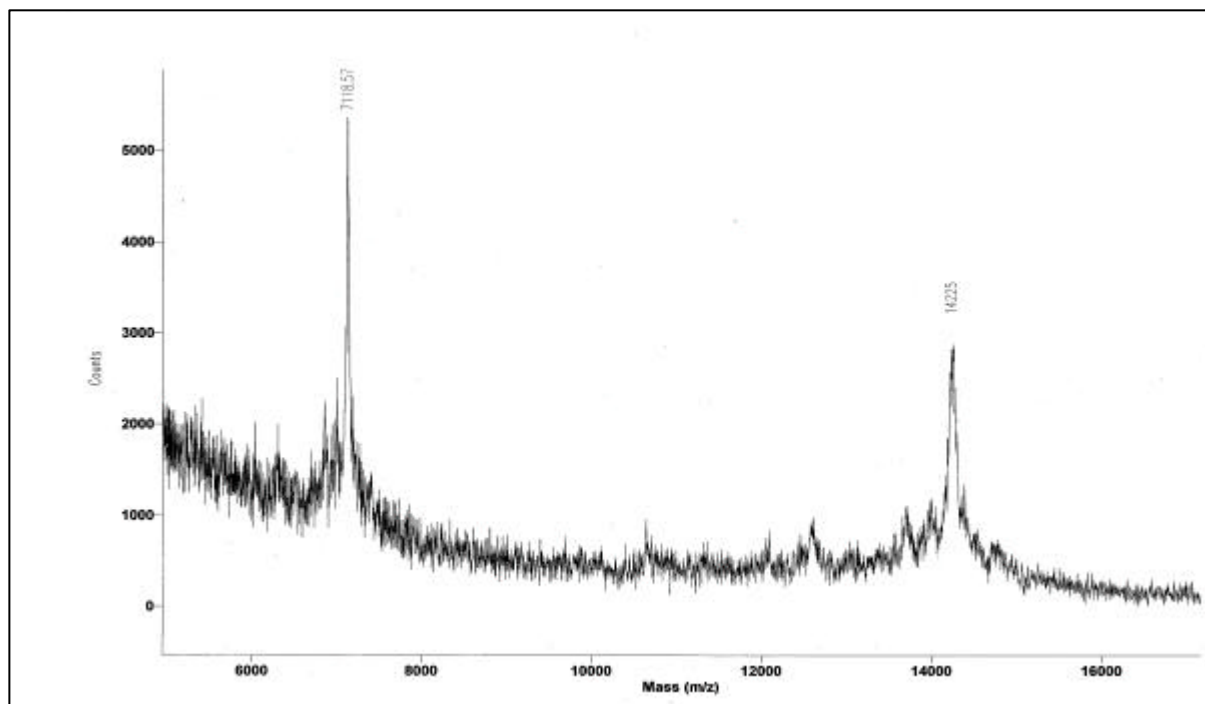


Abb. 25: MALDI-TOF-Massenspektrum von Abz-Lys(Bio)-Gly-RNase A (14225 D, MW ber.: 14223 D), Fraktion nach Aufreinigung mit monomerem Avidin.

(7118,57 = $M+2H^{2+}$, Abweichungen ergeben sich auf Grund der Tatsache, daß das Gerät auf einen Größenbereich von 14225 D geeicht wurde)

Ribonuklease A in den Elutionsfraktionen nachgewiesen wurde. Hierbei handelt es sich, wie aus dem Massenspektrum abzulesen ist, um eine einfache Markierung des

Zielproteins (s. Abb. 25). Die Bestimmung der Syntheseausbeute erfolgte wie unter 5.6.1. beschrieben und ergab einen Wert von 8,7% markierte RNase A. Auf Grund von Kontrollexperimenten kann im Gegensatz zum *wt-Trypsin* eine Degradation der RNase A [vgl. auch ARNOLD & ULBRICH-HOFMANN, 2001] durch *Trp D189K/K60E* während der Markierungsreaktion ausgeschlossen werden. Ebenso traten unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine spontanen Acylierungen des Targets durch den Acyldonor auf. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Trypsin seine Substrate spezifisch bindet, kann somit auf eine Modifizierung der N^{ϵ} -Amidgruppe des Lys¹ von RNase A geschlussfolgert werden. Dennoch sollte hierfür ein fundierter Nachweis erbracht werden, dessen Ablauf in Abb. 26 schematisch wiedergegeben ist. In einem initialen Schritt erfolgte zunächst eine limitierte Proteolyse der Abz-Lys(Bio)-Gly-modifizierten RNase A Moleküle durch *Subtilisin carlsberg*. Dabei spaltet diese Protease vorzugsweise die Ala²⁰-Ser²¹- Peptidbindung des Zielproteins [MARKERT et al., 2001; NENCI et al., 2001]. Hieraus resultieren zwei Fragmente, die als S-Peptid und S-Protein bezeichnet werden und auf Grund des signifikanten Größenunterschiedes mittels HPLC einfach aus dem Reaktionsansatz zu isolieren waren. Die Proteinspezies beider aufgefangenen Fraktionen wurden anhand von MALDI-TOF Messungen analysiert. Die Masse des größeren Fragments ist dabei identisch mit der des unmodifiziertes S-Proteins (s. Abb. 26, 3b), so daß eine unspezifische Acylierung innerhalb dieses RNase A Segments ausgeschlossen werden konnte. Aus dem anschließenden tryptischen Abbau des S-Peptids wurde durch HPLC-chromatographische Auftrennung und Analyse bei einer Wellenlänge von 320 nm ein Abz-enthaltendes Peptid isoliert. Die aus den MALDI-TOF Analysen hervorgehende Masse dieses Peptids konnte dem Abz-Lys(Bio)-Gly-Lys¹-OH – Spaltfragment zugeordnet werden, womit eine ausschließliche Modifizierung des *N*-terminalen Lys¹ als gesichert gilt. Dieser Befund schließt darüber hinaus eine Modifizierung der N^{ϵ} -Amidgruppe des Lys¹ der RNase A aus, da eine korrekte Einpassung der Lys¹-Seitenkette in die Bindungstasche von Trypsin erfolgte.

Der somit am Beispiel eines Proteins erbrachte Nachweis der Selektivität der *Trp D189K/K60E*-katalysierten Modifizierungsreaktion, die sich ausschließlich auf die *N*-terminale Amidgruppe des Targets beschränkt, sollte auf Grund der allgemeinen Gesetzmäßigkeit von Substratbindung und Katalyse des Trypsins [PERONA & CRAIK, 1995; CZAPINSKA & OTLEWSKI, 1999] auch auf andere *Trp D189K/K60E*-katalysierte Markierungsreaktionen übertragbar sein.

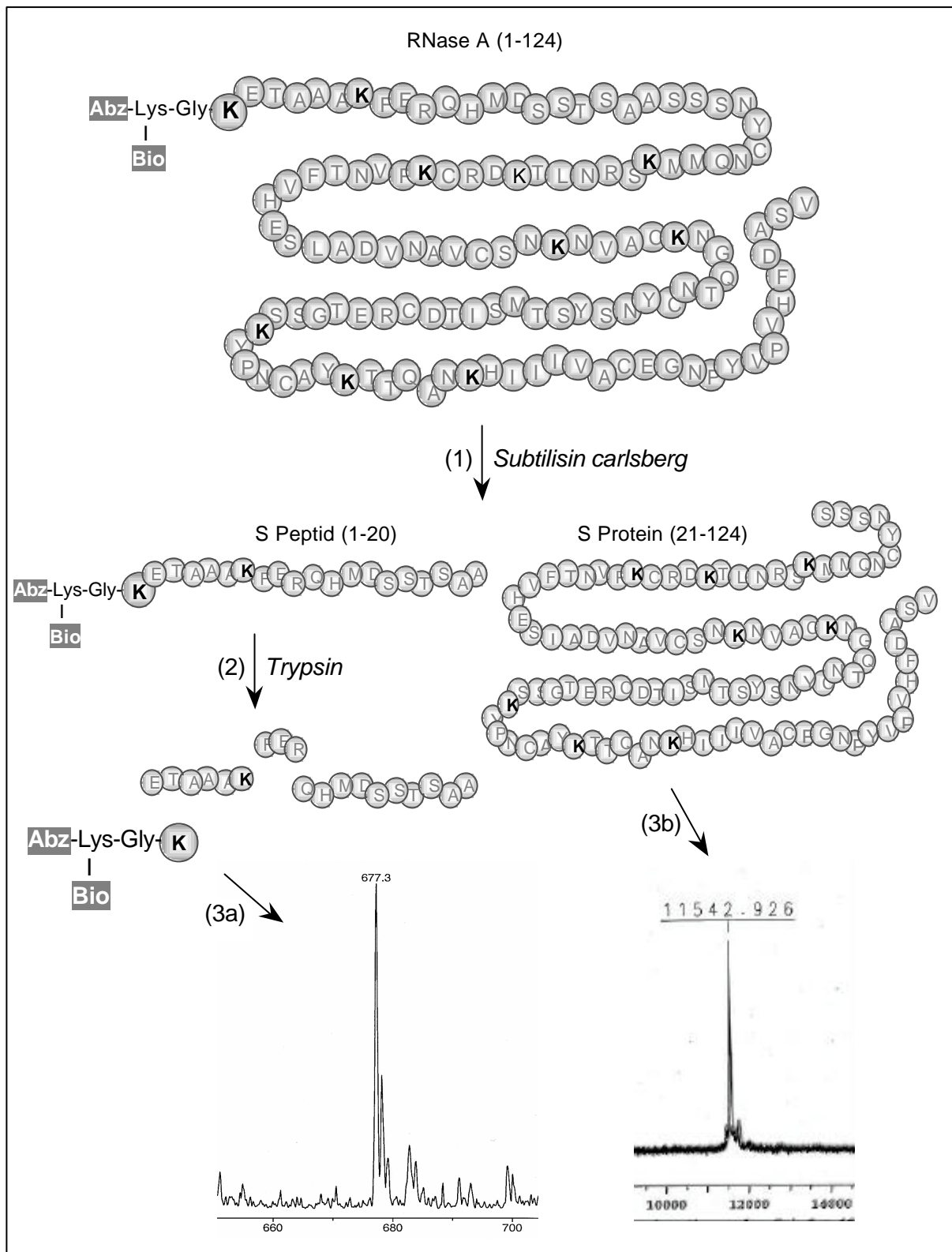


Abb. 26: Nachweis der *Trp* D189K/K60E-katalysierten selektiv *N*-terminalen Modifizierung von RNase A durch sequentiellen Verdau. (1) spezifische Spaltung des Zielproteins durch *Subtilisin carlsberg* in S Peptid und S Protein; (2) proteolytischer Abbau des S Peptids durch *Trypsin*; (3) Identifizierung der Spaltfragmente mittels Massenspektrometrie, (3a) Abz-Lys(Bio)-Gly-Lys¹-OH (677,3 D, MW ber.: 676,2 D), (3b) unmodifiziertes S Protein (11542,9 D, MW ber.: 11542,1 D)

Abschließend wurde der Einfluß der Markergruppierung auf die Katalyseeigenschaften der Ribonuklease A in einem Aktivitätstest untersucht. Hierfür wurden Fraktionen der Avidin-Säule herangezogen, die einerseits einzig und allein das markierte Traget enthielten und andererseits als Referenz ausschließlich unmarkierte RNase A beinhalteten. Die Proteinkonzentration beider Enzymlösungen wurde spektrophotometrisch bestimmt und aufeinander abgeglichen (s. Pkt. 5.6.5.). Der RNase-katalysierte Substratumsatz an zyklischem Cytidin 2':3'-Monophosphat wurde bei einer Wellenlänge von 268 nm über einen geeigneten Zeitraum mittels Photometer detektiert und ist in Abb. 27 graphisch dargestellt. Bei einem Vergleich der Anstiege beider Graphen konnte für die modifizierte RNase A eine Aktivität von 81% gegenüber dem unmodifizierten Enzym berechnet werden. Die katalytische Aktivität der RNase A wird somit durch die selektiv *N*-terminal eingeführte Modifizierung nicht signifikant beeinträchtigt.

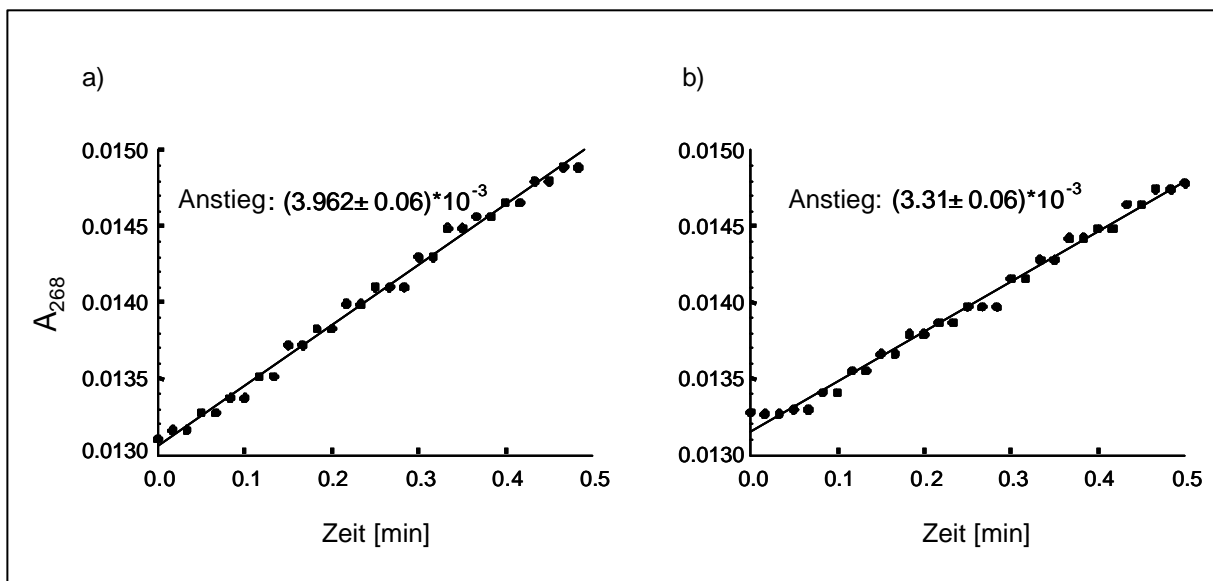


Abb. 27: Ribonuklease A Aktivitätstest, Umsatz von zyklischem Cytidin 2':3'-Monophosphat. a) unmodifizierte RNase A; b) Abz-Lys(Bio)-Gly-RNase A

Bedingungen: 0,1 M MES, 0,1 M NaCl, pH 6,0, [Substrat]: 2 mM, [Enzym]: 0,45 μ M, 25°C

In einem weiteren *Trp D189K/K60E*-katalysierten Markierungsexperiment konnte das aus *E. coli* stammende Parvulin 10 ebenfalls unter Verwendung von Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp erfolgreich modifiziert werden. Diese durch RAHFELD et al. 1994 erstmals beschriebene Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (PPIase) stellt mit 92

Aminosäuren den kleinsten Vertreter und den Prototyp der Parvuline dar [RAHFELD et al., 1994a u. b]. Die aus der Präparation des Ansatzes mittels Avidin-Säule erhaltenen Fraktionen wurden für eine Identifizierung der Proteinspezies MALDI-TOF Analysen zugeführt. Dabei geht aus dem Massenspektrum der Elutionsfraktionen eine einfache Markierung des Zielproteins hervor (s. Abb. 28). Neben der Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp-vermittelten Modifizierung von Parvulin 10 verliefen auch weitere Markierungen des Targets unter Verwendung von Bio-OGp sowie Bio-Gly-OGp prinzipiell erfolgreich (s. Abb. 29). Eine vollständige Isolierung des Bio- bzw. Bio-Gly-modifizierten Parvulins konnte jedoch säulenchromatographisch mittels monomerem Avidin nicht erreicht werden, was auf eine unzureichende Bindung der markierten Moleküle zurückgeführt werden kann. Hierin zeigt sich, daß für eine erfolgreiche Bindung des modifizierten Zielproteins das angeknüpfte Biotin in Bezug auf den Bindungspartner Avidin möglichst gut zugänglich sein sollte. Diesen Anforderungen scheint die Abz-Lys(Bio)-Gly-Markergruppierung in höherem Maß gerecht zu werden, da hierdurch eine gute Trennung des modifizierten vom nichtmodifizierten Target sowohl im Fall der RNase A als auch des Parvulin 10 erreicht wurde.

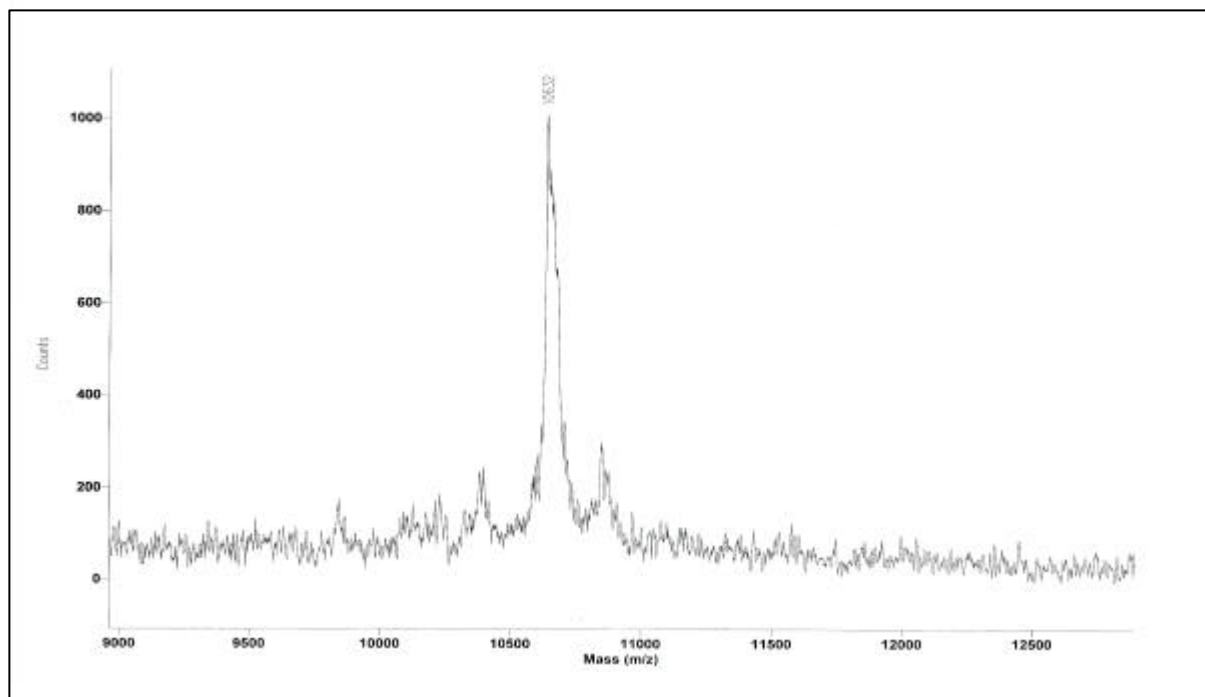


Abb. 28: MALDI-TOF-Massenspektrum von Abz-Lys(Bio)-Gly-Parvulin 10 (10632 D, MW ber.: 10632), Fraktion nach Reinigung mit monomerem Avidin.

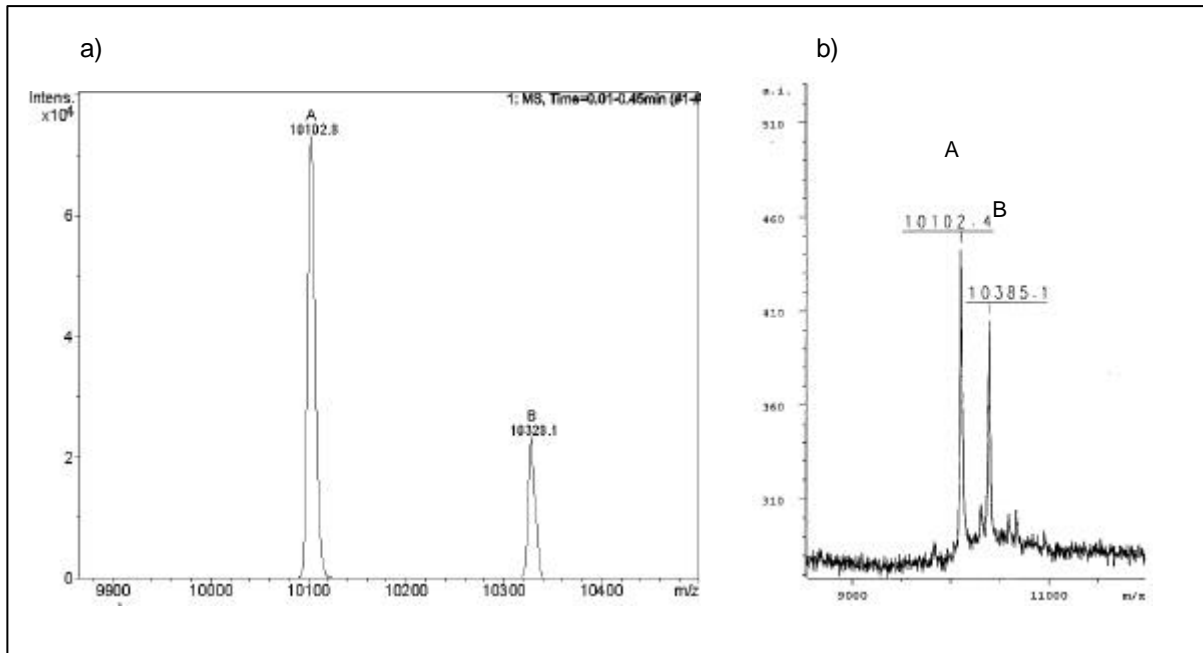


Abb. 29: a) Elektronenspray-Massenspektrum von Parvulin 10 (A) / Bio-Parvulin 10 (B, 10328,1 D , MW ber.: 10327 D), b) MALDI-TOF-Massenspektrum von Parvulin 10 (A) / Bio-Gly-Parvulin 10 (B, 10385,1 D, MW ber.: 10384 D).

Zusammenfassend demonstrieren die dargelegten Ergebnisse, daß mit der Variante *Trp D189K/K60E* erstmals eine Protease zur Verfügung steht, die auf Grund eines signifikant verbesserten Verhältnisses von Esterase- zu Amidaseaktivität ausgehend vom nativen Trypsin den Ansprüchen einer „Peptidligase“ gerecht wird. Im Gegensatz zu Wildtyp-Protease-katalysierten Segmentkondensationen bzw. Markierungsreaktionen, die nur unter Ausschluß sensibler Spaltstellen in den Adukten erfolgreich verlaufen, stellen *Trp D189K/K60E*-katalysierte Synthesen keine besonderen Anforderungen an die Aminosäuresequenz der Reaktanden. So konnten erstmals in unserem Arbeitskreis unter Verwendung dieses neuen Katalysators Substratmimetika-vermittelt Proteine selektiv an den *N*-Termini modifiziert werden. Hierin spiegeln sich gleichzeitig die Vorzüge der Stereo- und Regiospezifität Protease-katalysierter Reaktion gegenüber chemischen Markierungsmethoden wieder. In Kombination mit dem Substratmimetika-Konzept, das den Synthesereaktionen in der Planung größere Flexibilität verleiht, erschließt sich somit ein attraktiver Zugang zu bioaktiven Peptiden und Proteinen sowie deren selektiv modifizierten Derivaten.

4. Zusammenfassung

Die enzymatische Peptidsynthese unter Ausnutzung des reversen Hydrolysepotentials von Proteasen stellt auf Grund einer Reihe von Vorteilen gegenüber chemischen Methoden eine empfehlenswerte Alternative insbesondere für die Herstellung von Polypeptiden durch Segmentkondensationen dar. Gleichzeitig verschließen sich Proteasen in ihrer nativen Form einer universellen Anwendung, bedingt durch die restriktive Enzymspezifität und ihre native proteolytische Aktivität. Als eine der bislang effizientesten Strategien zur Umgehung des Spezifitätsproblems erwies sich das in unserem Arbeitskreis entwickelte Substratmimetika-Konzept, das auf einer gezielten Verschiebung der spezifitätsdeterminierenden Gruppierung von der P₁-Aminosäure konventioneller Substrate in die Esterabgangsgruppe des Substratmimetikums beruht. Ein interessanter Ansatzpunkt zur Minimierung der intrinsischen proteolytischen Aktivität von Wildtyp-Proteasen, die während der Synthese zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann, ist der gezielte Eingriff in die Struktur einer bekannten Protease. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Übertragung des Substratmimetika-Konzeptes auf eine Trypsin-Variante mit signifikant verbesserten synthetischen Eigenschaften.

Für eine erfolgreiche Verknüpfung von irreversibler und zugleich spezifitätsunabhängiger Ligationsstrategie wurde zunächst das Verhältnis von Esterase- zu Amidaseaktivität der Protease ausgehend vom nativen Ratten-Trypsin entscheidend verbessert. Dabei zeichnet sich der durch ortsgerichtete Modifizierung optimierte Synthesekatalysator durch eine marginale Amidaseaktivität aus, akzeptiert gleichzeitig jedoch entsprechende Substratmimetika mit spezifischer Abgangsgruppe gut. Das synthetische Potential der Trypsin-Variante konnte in Segmentkondensationen bei der Herstellung von Polypeptiden sowie selektiv *N*-terminalen Modifizierungen von Peptiden und Proteinen beispielhaft demonstriert werden.

Die experimentellen Arbeiten führten zu folgenden Ergebnissen:

Die Modifizierungen H57A bzw. S195C im Bereich der katalytischen Triade des Trypsin waren nicht geeignet, das synthetische Potential des Katalysators mit Hinblick auf eine praktische Anwendung zu erhöhen. Grund hierfür ist die unzureichende Aktivität der konstruierten Trypsin-Varianten gegenüber ausgewählten Substratmimetika.

Trotz einer festgestellten Präferenz der S_1 -Bindungstasche von Trypsinogen für aromatische Seitenketten waren die Zymogen-Varianten *Tgn K15A* bzw. *Tgn K15A/K60E* nicht in der Lage, die verwendeten Substratmimetika effizient zu hydrolysieren. Auch die Destabilisierung der Trypsinogenkonformation durch den Austausch D194G in *Tgn K15A/D194G* bzw. *Tgn K15A/D194G/K60E* führte nicht zu einer Erhöhung der Hydrolyseaktivität. Ursache hierfür sollte das nicht optimal ausgebildete Oxyanionloch in Kombination mit einer wenig produktiven Einbindung des Substrates sein. Eine Delokalisierung der Spezifität in die S_1' -Bindungsregion durch die Modifizierung K60E entsprechender Varianten gelang nicht.

Aus den Ergebnissen der *Trp D194N*-, *Trp D194N/K60E*-, *Trp D194N/D189S*- sowie *Trp D194N/D189S/K60E*-katalysierten Hydrolysestudien geht hervor, daß Varianten mit Zymogen-ähnlicher Konformation im Gegensatz zu echten Zymogenen Substratmimetika relativ gut akzeptieren. In nachfolgenden Acyltransferreaktionen tritt vor allem die Variante *Trp D194N/D189S/K60E* auf Grund ihrer signifikant verminderten proteolytischen Aktivität hervor. Dieser neue Katalysator wurde in weiteren Synthesereaktionen unter Verwendung von Guanidinophenylestern mit variabler P_1 -Aminosäure erfolgreich eingesetzt.

Die Deletion der Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁹¹ und Cys²²⁰ in *Trp C191A* führt zu einer unspezifischen Trypsin-Variante mit relativ hoher Amidaseaktivität. Interessanter Weise wirkt sich die Eliminierung der Disulfidbrücke auf die proteolytische Aktivität des Katalysators gegenüber basischen Aminosäuren in P_1 -Position des Substrates prägnanter aus, als die Induktion einer Zymogen-ähnlichen Konformation in *Trp D194N*.

Unter den konstruierten Trypsin-Varianten zeichneten sich die Katalysatoren mit einem Elastase-ähnlichen S_1 -Bindungsbereich durch die höchste Esteraseaktivität aller in dieser Arbeit getesteter Varianten bezogen auf das spezifischste Mimetikum aus. Gleichzeitig bewirkt die gerichtete Modifizierung der primären Bindungstasche ausgehend vom nativen Katalysator in den durchgeführten Acyltransferreaktionen eine signifikante Verminderung proteolytischer Folgereaktionen, wobei die Syntheseeffizienz der einzelnen Varianten stark variiert. In weiterführenden Modellversuchen unter Verwendung von Substratmimetika mit variabler P_1 -Aminosäure und *Trp D189S/G216V/G226T/K60E* zeigte sich jedoch, daß trotz

verbesserter synthetischer Eigenschaften das Substratmimetika-Konzept nicht vollständig übertragen werden konnte. So wurde ein signifikanter Einfluß des P₁-Restes auf die Reaktivität des Katalysators gegenüber dem Substratmimetikum festgestellt.

Die Substitution des negativen Asp¹⁸⁹ am Grund der S₁- Bindungstasche von Trypsin in *Trp D189S*, *Trp D189K*, *Trp D189R*, *Trp D189H* führte zu einer veränderten Primärspezifität des Katalysators für aromatische Reste in P₁-Position des Substrates. Die in Acyltransferreaktionen ermittelten Daten bestätigten weiterhin die Annahme, daß eine Modifizierung des Restes 189 in der S₁-Bindungstasche die Aktivität gegenüber spezifischen Amidbindungen in größerem Maß herabsetzt als die Esteraseaktivität entsprechender Trypsin-Varianten. Bemerkenswert hierbei ist jedoch der Befund, daß Bezug nehmend auf die für *Trp D189A/S190A* ermittelten Daten die Eliminierung des negativen Restes Asp¹⁸⁹ allein nicht ausreicht, um die Amidaseaktivität der Protease generell effizient auszuschalten.

Es konnte an Hand der um Glu⁶⁰ erweiterten Trypsin-Varianten erstmals ein signifikanter Einfluß des S₁'-Bindungsbereiches auf die Spezifität von Trypsin gegenüber Substratmimetika beobachtet werden. Dabei scheint Glu⁶⁰ die Substratbindung in fast allen Kombinationsvarianten auf Grund ähnlicher Spezifitätsprofile in gleicher Weise zu beeinflussen. Folglich wird die OGp-Abgangsgruppe entsprechender Estersubstrate um den Faktor 2 bis 3 besser akzeptiert als andere Abgangsgruppenstrukturen. Weiterhin induzierte die zusätzliche Substitution K60E im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangsvarianten einen Ausbeute-steigernden Effekt, vermutlich bedingt durch eine bessere Einbindung des Acylakzeptors im S'-Bereich des Katalysators. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Modellreaktionen eine höhere Stabilität synthetisierter Peptide detektiert werden, die zum Teil auf eine Glu⁶⁰-bedingte Verminderung der Amidaseaktivität entsprechender Katalysatoren zurückgeführt wurde. Somit zeichnen sich die um Glu⁶⁰ erweiterten Kombinationsvarianten in vielen Fällen durch verbesserte synthetische Eigenschaften aus.

Die Variante *Trp D189K/K60E* zeigte neben der erwarteten Präferenz für die Guanidinophenylfunktion entsprechender Substratmimetika ein signifikant verbessertes Verhältnisses von Esterase- zu Amidaseaktivität. Die in den

Modellreaktionen synthetisierter Peptidprodukte unterlagen dabei lediglich einer marginalen Sekundärhydrolyse, vorzugsweise nach Tyrosin, wobei Produktausbeuten von über 90% einen hoch effizienten Acyltransfer dokumentierten. Somit stellte die Variante *Trp D189K/K60E* einen geeigneten Kandidaten für weitere anwendungsbezogene Modellreaktionen dar.

Im Rahmen einer enzymologischen Charakterisierung der Variante *Trp D189K/K60E* wurden kinetische Parameter für die Hydrolyse ausgewählter Ester- bzw. Amidsubstrate sowie die daraus abgeleiteten Spezifitätskonstanten bestimmt und mit denen anderer Katalysatoren verglichen. Dabei bestätigten die erhaltenen Daten die Vermutung, daß die zusätzliche Modifizierung K60E die Amidaseaktivität des Katalysators ausgehend von *Trp D189K* weiter herabsetzt und die Spezifität gegenüber der Guanidinophenyl-Abgangsgruppe im Vergleich zur Ausgangs-Variante erhöht. Ausschlaggebend für diese Spezifitätserhöhung könnte eine veränderte Einpassung des Guanidinophenylesters durch *Trp D189K/K60E* bezogen auf *Trp D189K* sowie *wt Trypsin* sein, wie Computer-unterstützte Bindungsstudien darlegten.

Die Variante *Trp D189K/K60E* zeigt eine im S_1' -Bindungsort signifikante Spezifität für basische Aminosäuren, die sowohl unter Verwendung eines Standard-Estersubstrates als auch verschiedener Substratmimetika in Acyltransferreaktionen nachgewiesen wurde. Diese Glu⁶⁰-bedingte Präferenz für basische Reste in P_1' -Position des Substrates ist um ca. 1,5 Größenordnungen höher als im nativen *wt Trypsin* und ca. 2,5 Größenordnungen höher als in *Trp D189K*.

Mit der Zielstellung der Übertragung des Substratmimetika-Konzeptes auf die Variante *Trp D189K/K60E* wurden Synthesereaktionen unter Einsatz von OGP-Estern mit variablem P_1 -Rest durchgeführt. Die resultierenden Ergebnisse belegen einen effizienten Acyltransfer, wobei unter Verwendung von *Trp D189K/K60E* erstmals eine Trypsin-katalysierte Substratmimetika-vermittelte Knüpfung von D-Aminosäuren auf Acylakzeptoren mit spezifischen Aminosäureresten gelang. Darüber hinaus verlief auch die Substratmimetika-vermittelte Verknüpfung einer Carbonsäure mit verschiedenen Peptiden erfolgreich. Hierfür kam exemplarisch der Phenylbuttersäure-OGP-Ester zum Einsatz, der über die spezifisch erkannte Abgangsgruppen-Struktur zu einer erfolgreichen Acylierung des Katalysators führte, welcher nachfolgend durch verschiedene Peptide deacyliert werden konnte.

Das synthetische Potential der Variante Trp *D189K/K60E* konnte schließlich in Segmentligationen beispielhaft demonstriert werden. Auf Grund des signifikant verbesserten Verhältnisses von Esterase-/Amidaseaktivität der Protease wurden die synthetisierten Polypeptide praktisch nicht abgebaut.

In Trp *D189K/K60E*-katalysierten Reaktionen konnte unter Einbeziehung der Substratmimetika-Strategie auf Grund des signifikant verbesserten Synthesepotentials des Katalysators neben der Derivatisierung von Peptiden erstmals eine Protease-katalysierte selektiv *N*-terminale Einführung von Markergruppen in Proteine realisiert werden. Dabei gelang es, am Beispiel der Ribonuklease A einen fundierten Nachweis für die ortsgerichtete Modifizierung des Targets durch Trp *D189K/K60E* zu erbringen. Es zeigte sich weiterhin, daß kein signifikanter Aktivitätsverlust des Zielproteins durch die Markergruppierung hervorgerufen wurde. Das Konzept der Substratmimetika-vermittelten selektiven Modifizierung ließ sich unter der Katalyse von Trp *D189K/K60E* auch auf das *E.coli* Parvulin 10 übertragen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeine experimentelle Bedingungen

Reagenzien: Alle verwendeten Reagenzien entsprachen der Kategorie „pro analysis“ und wurden, wenn nicht anders erwähnt, kommerziell bezogen. Die verwendeten Ester- bzw. Peptidsubstrate entstammen der Laborsammlung der Arbeitsgruppe. Substrate für die Markierung von Peptiden und Proteinen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Nicole Wehofsky bzw. DBC Dirk Wildemann von der Arbeitsgruppe Dr. Frank Bordusa Max Planck Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ zur Verfügung gestellt. Das *E. coli* Parvulin 10 entstammt der Arbeitsgruppe von Prof. Fischer (Max Plank Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“). Rekombinantes Insulin, RNase A sowie Trypsin (TPCK-behandelt) wurden von der Firma SIGMA, α -Chymotrypsin (TLCK-behandelt) von der Firma FLUKA bezogen. Trypsin und α -Chymotrypsin wurden in 1 mM HCl gelöst und bei -25°C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch (s. Pkt. 5.2.5.).

Massenspektrometrie: Die Messungen zur Ermittlung der Molekulargewichte erfolgten am Institut für Analytische Chemie der Universität Leipzig an einem Gerät des Typs KRATOS Kompakt MALDI 5 V 5.1.2 bzw. am MPI Halle an einem Ionenfallen-Massenspektrometer mit Elektronensprayquelle Esquire-LC der Firma BRUCKER bzw. an einem Reflex Massenspektrometer der Firma BRUCKER (Bremen).

Plasmide: Die verwendeten Plasmide pST und pYT bzw. pMP50 wurden in ihrer nativen Form von Frau Prof. L. Hedstrom, Brandeis University Waltham USA, die pST-Plasmide der Varianten D189S bzw. D189K sowie das pYT-Plasmid mit der Mutation K60E von Dr. T. Kurth freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zur Durchführung der ortsgerichteten Mutagenesen kam der *E.coli* Vector pST (shuttle-Vektor) in seiner nativen Form zum Einsatz. Dieser enthält einen Teil des Bluescript-Vectors sowie das Gen für anionisches Rattentrypsin II, das mit einem a-factor-leader sowie einem ADH/GAPDH-Promotor fusioniert ist [HEDSTROM et al, 1992]. Die Proteinexpression erfolgte mit Hilfe des pYT-Plasmides (Expressions-Vektor), einem pBS24-Abkömmling, das Selektions-Marker für Uracil- und Leucin-defizientes Medium trägt. Sowohl das pST- als auch das pYT-Plasmid verfügt über ein Ampicillinresistenz-Gen. Die Karten beider Vektoren mit bedeutenden Schnittstellen sind in Abb. 30 dargestellt.

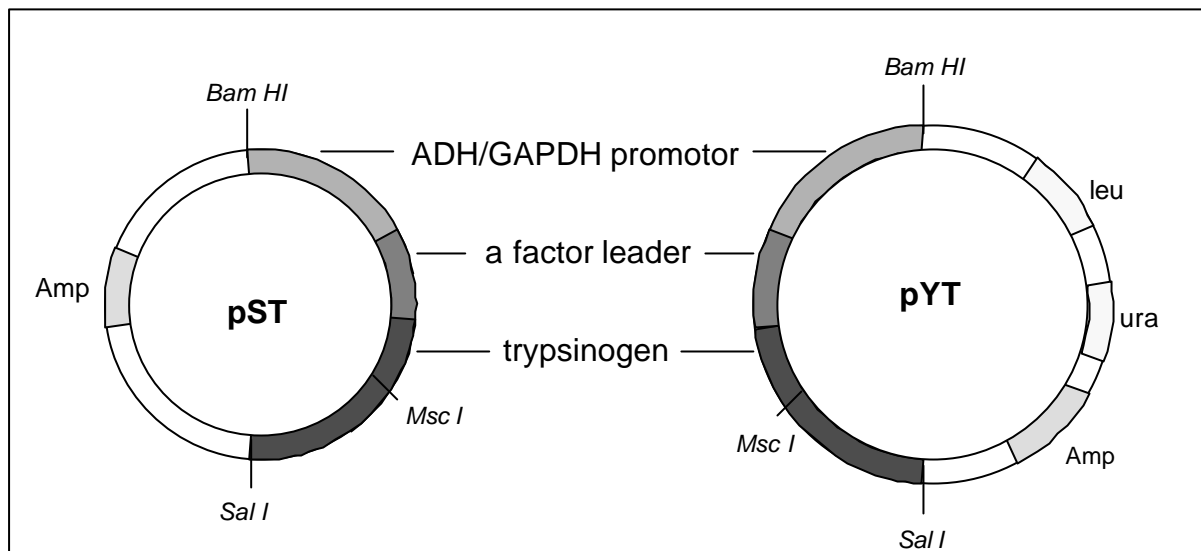


Abb. 30: Schematischer Aufbau des pST- und pYT-Plasmids

5.2. Konstruktion, Expression und Reinigung von Trypsin- bzw. Trypsinogen-Varianten

5.2.1. Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechten Mutagenesen wurden unter Verwendung des Quik change[®]-Kit (STRATAGENE) im *E.coli* Plasmid pST durchgeführt. Als Primer wurden die von der Firma MWG-Biotech bezogenen Oligonukleotide (s. Tab. 20) verwendet, als Template DNA zum Einführen einzelner Punktmutationen diente der native pST-Vektor. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in superkompetente bzw. ultrakompetente *E. coli* XLII blue Zellen (STRATAGENE) transformiert. Die anschließende Selektion erfolgte auf Ampicillin-haltigen Nähragarplatten (LB-amp). Die hiervon gepickten Kolonien wurden in ein Ampicillin-haltiges Flüssigmedium (LB-amp) überführt wobei nach eintägiger Kultivierung die Isolierung des Plasmides unter Verwendung des SNAP-Kit (INVITROGENE) durchgeführt werden konnte. Die Kontrolle der isolierten DNA erfolgte mittels Elektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel. Durch Sequenzierung des kompletten Gens konnte sichergestellt werden, daß nur die gewünschten Mutationen enthalten waren. Für Varianten mit multiplem Aminosäureaustausch diente der bereits mit einer Mutation versehene pST-Vektor als Template DNA. Im Fall von Varianten mit drei Punktmutationen wurde das auf diese Weise erhaltene Produkt erneut als Template eingesetzt.

Tab. 20: Mutagenese-Primer zum Austausch einzelner Aminosäuren im pST-Vektor, fettgedruckte Buchstaben kennzeichnen das modifizierte Codon

K15A	a)	5' - T GAT GAT GAC GCC ATC GTT GGA G - 3'
	b)	5' - C TCC AAC GAT GGC GTC ATC ATC A - 3'
H57A	a)	5' - TCT GCA GCT GCC TGC TAT AAG - 3'
	b)	5' - CTT ATA GCA GGC AGC TGC AGA - 3'
D189H	a)	5' - GGA GGC AAG CAC TCC TGC CAG - 3'
	b)	5' - CTG GCA GGA GTG CTT GCC TCC - 3'
D189R	a)	5' - GGA GGC AAG CGT TCC TGC CAG - 3'
	b)	5' - CTG GCA GGA ACG CTT GCC TCC - 3'
C191A	a)	5' - AAG GAT TCC GCC CAG GGT GAC - 3'
	b)	5' - GTC ACC CTG GGC GGA ATC CTT - 3'
D194G	a)	5' - TGC CAG GGT GGC TCT GGT GGC - 3'
	b)	5' - GCC ACC AGA GCC ACC CTG GCA - 3'
D194N	a)	5' - TGC CAG GGT AAC TCT GGT GGC - 3'
	b)	5' - GCC ACC AGA GTT ACC CTG GCA - 3'
S195C	a)	5' - CAG GGT GAC TGT GGT GGC CCT - 3'
	b)	5' - AGG GCC ACC ACA GTC ACC CTG - 3'
G216V	a)	5' - GTC TCC TGG GTC TAT GGC TGT - 3'
	b)	5' - ACA GCC ATA GAC CCA GGA GAC - 3'
G226T	a)	5' - GAT AAC CCT ACT GTG TAC ACC - 3'
		5' - GGT GTA CAC TGA AGG GTT ATC - 3'

5.2.2. Subklonierung

Für alle im pST-Plasmid erzeugten Trypsin-Mutanten war eine Subklonierung in den pYT-Expressions-Vektor notwendig. Diese erfolgte durch Restriktionsverdau des pST-Plasmides mit BamHI und Sall und Ligation in das korrespondierende pYT-Vektor-Fragment. Alle Vektor-Fragmente wurden im entsprechenden Restriktionsmix auf ein niedrig schmelzendes Agarosegel (0,8%) aufgetragen und nach ausreichender Auftrennung ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden bei 55 °C

geschmolzen und in geeigneter Konzentration in ein Eppendorfgefäß überführt, wobei der Ligationsansatz unter Zugabe von T4 DNA Ligase bei 16 °C über Nacht inkubiert wurde.

Für alle Trypsin-Varianten die zusätzlich einen K60E Austausch enthielten, erfolgte ein Sall, MscI Doppelverdau des entsprechenden pST- und des K60E pYT-Vektors. Das aus dem pYT-Plasmid ausgeschnittene Fragment wurde bei der nachfolgenden Ligation durch das Analoga der entsprechenden pST-Vektoren mit Mutation in Position 15 (A), 189 (H,K,R), 194 (G,N), 216 (V), 226 (T) sowie weiterer Kombinationen ersetzt. Die abermals notwendige Transformation und Plasmidisolierung erfolgte wie oben beschrieben.

Eine erfolgreiche Subklonierung ließ sich durch ein charakteristisches Restriktionsmuster des EcoRI und BamHI verdauten pYT-Plasmides im Agarosegel nachweisen.

5.2.3. Hefetransformation und Selektion

Der verwendete Hefezellstamm (*Saccharomyces cerevisiae* DLM 101a [Mat a, leu 2-3, -112 his 2, 3-11, -15 can 1, ura 3?, pep4?, [cir⁰], DM 23]) wurde freundlicherweise von Frau Prof. L. Hedstrom Brandeis University zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen und die Transformation der pYT Plasmide kam der EZ-Hefe-Transformationskit (ZYMO-RESEARCH) zum Einsatz. Die Selektion erfolgte auf Uracil-defizienten Platten durch Bebrütung bei 30 °C für 3 bis 4 Tage. Einzelkolonien wurden weiter überimpft auf Leucin-defiziente Platten und ebenfalls 3 bis 4 Tage bei 30 °C inkubiert, wodurch die Kopienzahl des Plasmides in den Zellen zunahm. Einzelkolonien dieser Platten wurden zum Animpfen der Vorkulturen des Leucin-defizienten Flüssigmediums mit 8% Glucose herangezogen. Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler bei 30 °C und 120 rpm für 3 Tage. Als Inokulum zum Animpfen der 1 Liter Hauptkulturen mit YPD-Medium (1% Glucose, 1% Bactopecton, 0,5% Hefeextrakt) wurden 20 ml Vorkultur eingesetzt. Die Inkubationsparameter entsprachen denen der Vorkultur, wobei nach 4 Tagen geerntet wurde.

5.2.4. Isolierung und Reinigung der Trypsin-Varianten

Durch Zentrifugation für 20 min bei 4000 rpm wurden zunächst die Zellen separiert und der pH des Kulturüberstandes mit 1 M HCl auf 4,5 eingestellt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 12 000 rpm. Der praktisch partikelfreie Trypsinogen-haltige Überstand wurde auf eine mit 2 mM Na-Acetat/100 mM AcOH (pH 4,5) equilibrierte Toyopearl 650 M (SUPELCO) Kationenaustauschersäule aufgetragen. Die Elution erfolgte unter Verwendung eines linearen pH-Gradienten (von 2 mM Na-Acetat/ 100 mM Essigsäure pH 4,5 bis 200 mM Tris/HCl pH 8). Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Methode von LAEMMLI, 1979) unter Verwendung eines 15-proz. Polyacrylamid-Geles konnten die Trypsinogen-enthaltenden Fraktionen identifiziert und zusammengefaßt werden. Das Volumen der Proteinlösungen wurde mit Hilfe von Centriprep-Röhrchen (AMICON) auf etwa 10 bis 15 ml eingeengt. Die Aktivierung des Trypsinogens erfolgte mittels hochaufgereinigter Enterokinase (BIOZYME) bei pH 6,5 und wurde durch SDS-Gelelektrophorese verfolgt.

Unter Verwendung von SBTI-Agarose (SIGMA) ließen sich *wt Trypsin* sowie die Varianten *Trp D194N*, *Trp D194N/K60E*, *Trp D189S* und *Trp D194N/D189S* aufreinigen. Hierzu wurden die Proben auf eine mit 50 mM Tris/HCl pH 6,5 equilibrierte SBTI-Agarosesäule aufgetragen und mit 0,5 M NaCl (*Trp D189S*, *Trp D194N/D189S*) bzw. 0,1 M Ameisensäure (*Trp D194N*, *Trp D194N/K60E*) eluiert. Die Reinheit des Trypsins in den einzelnen Fraktionen wurde durch SDS-Gelelektrophorese überprüft und ausgewählte Fraktionen zusammengefasst. Danach wurden die Proteinlösungen bei 4 °C gegen 1 mM HCl dialysiert und erneut auf etwa 2 bis 4 ml eingeengt.

Auf Grund der unzureichenden Affinität gegenüber SBTI-Agarose wurden alle übrigen Trypsin- sowie die Trypsinogen-Varianten mittels Perfusionschromatographie unter Verwendung einer Biocad Sprint Anlage (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS) gereinigt. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte auf einer mit 0,5% Bis-/Tris-Propan pH 6 equilibrierten POROS 20 HQ – Säule (4 x 100 mm, PERSEPTIVE BIOSYSTEMS), ein starker Anionenaustauscher, und nachfolgender Gradientenelution bis 95% 3 M NaCl. Die Trypsin- bzw. Trypsinogen- enthaltenden Fraktionen wurden mit Hilfe eines SDS-Geles auf Reinheit überprüft und zusammengefasst. Abschließend erfolgte die Dialyse gegen 1 mM HCl bei 4 °C und Einengung der Proben mit Centriprep-

Konzentratoren auf 2 bis 4 ml. Die Endausbeuten beliefen sich auf etwa 2 bis 5 mg Protein pro Liter Kulturmedium.

5.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Präparate wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) an einem Hitachi U2000 Spektrophotometer bzw. einem Spektro-Photometer des Typs Novaspec[®] II (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Aufnahme der Eichkurve erfolgte anhand einer Rindertrypsin-Verdünnungsreihe zwischen 50 µg/ml und 1 mg/ml Protein.

5.3. HPLC Analytik

Die zur Quantifizierung von Hydrolysestudien bzw. Acyltransferreaktionen durchgeführten analytischen RP-HPLC-Analysen erfolgten an folgenden Geräten:

- a) SHIMADZU HPLC-System mit Autoinjektor SIL-6B, 2 Pumpen LC-6A, UV-Detektor SPD-6AV, Systemcontroller SCL-6B, Integrator C-R4AX;
- b) BISCHOFF HPLC-System mit BISCHOFF Central Processor, ? 1000 Durchflußdetektor und einem CSI-D/A-Wandler mit zugehöriger Software (Hyperdata 2.06 bzw. 2.10, CHROMOSOFT), TSP Autosampler der Firma THERMOSEPARATION PRODUCTS;
- c) HPLC-System der Firma GILSON mit Autoinjektor 235, Pumpensystem 321, Detektor UV/VIS-155 und zugehöriger Gilson-Unipoint-Software.

Die Trennung der Reaktionsgemische erfolgte den Trennerfordernissen entsprechend isokratisch oder unter Verwendung eines geeigneten linearen Gradienten. Eluiert wurde mit Wasser (Aqua dest.) – Acetonitril – Gemischen mit einem Anteil von 0,1% TFA. Die Detektion erfolgte bei $\lambda=280$ nm (Tyrosin-haltige peptidsubstrate, $\lambda=254$ nm (Substratmimetika), $\lambda=220$ nm (Peptide ohne Aromat) bzw. $\lambda=320$ nm (Abz- geschützte Substrate).

Die Reaktionsumsätze wurden aus den Peakflächenintegralen des Estersubstrates und der Aminolyse- bzw. Hydrolyseprodukte berechnet. Alle Ergebnisse stellen Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Meßreihen dar.

Die Proben der Esterhydrolysen wurden mit einer C8 – Säule Grom Capcell (Type SG 120Å, 5 µm, 4,5 x 250 mm, SHISEIDO) bzw. C4 – Säule Grom Capcell (5 µm, 4,5 Ø x 125 mm) unter isokratischen Laufbedingungen bei einem Fluß von 1,0 ml/

min analysiert. Die Meßreihen zur Ermittlung der p-Werte wurden auf einer C18-Säule des Typs Vydac 218TP54 (5 μm , 300 \AA , 4,5 x 250, THE SEPARATION GROUP) unter isokratischen Laufbedingungen mit einem Fluß von 1,0 ml/min durchgeführt. Reaktionsgemische aller weiteren Acyltransferexperimente wurden unter Verwendung eines optimalen Gradienten mit einem Fluß von 1,0 ml/min wahlweise auf oben genannter C8 – bzw. C18 - Säule eluiert.

5.4. Enzymkatalysierte Reaktionen

Die Acyltransferreaktionen sowie die Esterhydrolysen wurden in einem 1,5 ml Polypropylengefäßen mit einem Thermomixer Eppendorf 5436 bei 30 °C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet.

Durch Überführung von Aliquoten des Reaktionsansatzes in eine Stopplösung (1 % TFA, 50% Methanol in Wasser, bzw. 5% Essigsäure, 50% Methanol in Wasser für Boc-geschützte Substrate) wurden die Reaktionen nach verschiedenen Zeitintervallen abgestoppt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches wurde mit der RP-HPLC unter geeigneten Bedingungen analysiert. Um das Ausmaß der spontanen Esterhydrolyse (<5%) zu untersuchen und eine nichtenzymatische Aminolyse auszuschließen, wurden stets Kontrollansätze ohne Protease mitgeführt.

5.4.1. Hydrolysereaktionen

Um eine vollständige Löslichkeit des Substrates zu erzielen wurden die verwendeten Substratmimetika unmittelbar vor Versuchsbeginn zunächst in Dimethylformamid angelöst. Die Reaktionen verliefen in 0,1 M HEPES Puffer (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01M CaCl_2 mit einer Substratkonzentration von 2 mM Ester und 8% v/v DMF und wurden durch Zugabe des jeweiligen Enzyms gestartet. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen sind den jeweiligen Abbildungen bzw. Tabellen zu entnehmen. In festgelegten Zeitabständen erfolgte das Abstoppen der Reaktion wie oben beschrieben.

5.4.2. Acyltransferreaktionen

Die verwendeten Estersubstrate wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn zunächst in Dimethylformamid angelöst und eine wässrige Stammlösung der benötigten

Konzentration hergestellt. Die Acylakzeptoren (Aminosäureamide bzw. Peptide) wurden in HEPES-Puffer gelöst und die Stammlösungen ggf. mit NaOH auf pH 8,0 rejustiert. Bei den angegebenen Konzentrationen im Ansatz, ausgenommen die Segmentkondensationen und *N*-terminalen Modifizierungen, handelt es sich um effektive Nukleophilkonzentrationen $[HN]$, die sich aus der totalen Nukleophilkonzentration $[N]$ und deren pK-Wert sowie dem pH-Wert des Reaktionsansatzes nach Gl. 4 berechnet.

$$[HN]_{\text{eff}} = [HN]_0 / (1 + 10^{\text{pK} - \text{pH}}) \quad (4)$$

Die pK-Werte entstammen der Literatur [ULLMANN, 1995]. Die Reaktionen verliefen in 0,1 M HEPES Puffer (pH 8,0) und einer Konzentration von 2 mM Ester, 15 mM Nukleophil sowie 8% v/v DMF und wurden durch Zugabe der Enzyme gestartet. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen sind den jeweiligen Abbildungen bzw. Tabellen zu entnehmen. Die Ermittlung der p-Werte erfolgte in einem Zeitbereich, in dem keine Sekundärhydrolyse des gebildeten Peptidproduktes auftrat. Um das Ausmaß

5.4.3. Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Die hydrolysekinetischen Untersuchungen wurden unter stady-state-Bedingungen bei einem maximalen Substratumsatz von 10% durchgeführt. Auf Grund begrenzter Wasserlöslichkeit einiger Substratmimetika erfolgte die Herstellung der Substratlösung unmittelbar vor Versuchsbeginn zunächst in DMF, wobei der Anteil an Lösungsmittel im Ansatz 8% (v/v) betrug. Die Hydrolysen wurden in 25 mM MOPS-Puffer, 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl bei pH 7,6 durchgeführt. Die Substratkonzentrationen variierten zwischen 1/10 und 10 K_M . Es wurden dem jeweiligen Reaktionsansatz zu definierten Zeiten Proben entnommen und je nach Art des Substrates (s. Pkt. 5.4.) in eine Stopplösung überführt. Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte chromatographisch mit dem unter 5.3. c) spezifizierten HPLC-System unter Verwendung eines Gradienten.

Die kinetischen Parameter K_M und V_{max} wurden durch nichtlineare Regression der erhaltenen dv/dt -Meßwerte und den dazugehörigen Substratkonzentrationen bestimmt. Hierfür wurde die Software Sigma Plot-Enzyme (Version 6.0, Jandel Corp., USA) verwendet. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung (k_{cat}) erfolgte aus dem Verhältnis von $V_{\text{max}}/[E]_{\text{absolut}}$. Das Ausmaß der Spontanhydrolyse betrug in allen Reaktionen unter 3%.

5.5. N-terminale Modifizierung von R-Insulin und *E.coli* Parvulin 10

Die Herstellung einer 200 mM Stammlösung des Substrates Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp erfolgte unmittelbar vor Reaktionsbeginn in DMF. Rekombinantes Insulin wurde in einer 2 mM Stammlösung in 0,2 M HEPES (pH 8,0), 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl₂ gelöst. Die Zugabe des Substratmimetikums erfolgte in 5 aufeinander folgenden Schritten, wobei in Vorversuchen sichergestellt wurde, daß vor jeder erneuten Zugabe der bereits im Ansatz vorhandene Ester vollständig umgesetzt war. Die Endkonzentration an DMF betrug zwischen 2% und 9,3 %, die des Katalysators *Trp D189K/K60E* 8×10^{-5} M. Der Acyldonor lag in einer Endkonzentration von 4 mM, R-Insulin in einer Endkonzentration von 1 mM vor. Nach Ablauf der Acyltransferreaktion bei 30 °C wurden die Proben des Modifizierungsansatzes von R-Insulin wie unter 5.4. beschrieben nach insgesamt 25 min abgestoppt. Anschließend erfolgte die Auswertung der Reaktionen mittels HPLC-Analytik ohne vorherige Reinigungsschritte. Die Ausbeutebestimmung erfolgte anhand der bei einer Wellenlänge von 320 nm (es absorbiert lediglich die 2-Abz-Gruppierung) aufgenommenen Chromatogramme.

Die Modifizierungen des *E. coli* Parvulin 10 wurden in 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂ mit einer Endkonzentration von 0,35 mM *E. coli* Parvulin 10, 4 mM Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp bzw. 4 mM Bio-Gly-OGp bzw. 4 mM Bio-OGp sowie einer Enzymkonzentration zwischen 5×10^{-6} und 1×10^{-5} M *Trp D189K/K60E* bei 30 °C durchgeführt. Die Ansätze wurden nach dem Ende der Reaktion zur Aufreinigung des modifizierten Targets über eine Avidin-Säule gegeben (s. Pkt. 5.6.2.), wobei lediglich im Fall des Abz-Lys(Bio)-Gly-modifizierten Parvulin 10 eine ausreichende Trennung erzielt werden konnte (s. Massenspektren Abb. 28 u. 29).

5.6. N-terminale Modifizierung von RNase A

5.6.1. Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp-vermittelter Acyltransfer

Die Herstellung einer 200 mM Stammlösung des Substrates Abz-Lys(Bio)-Gly-OGp erfolgte unmittelbar vor Reaktionsbeginn in DMF. Es erfolgte die Herstellung einer 2 mM RNase A Stammlösung in 0,2 M HEPES (pH 8,0), 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl₂. Die Zugabe des Substratmimetikums erfolgte in 5 aufeinander folgenden Schritten, wobei in Vorversuchen sichergestellt wurde, daß vor jeder erneuten Zugabe, der

bereits im Ansatz vorhandene Ester vollständig umgesetzt war. Die Endkonzentration an DMF betrug zwischen 2% und 9,3 %, die des Katalysators *Trp D189K/K60E* 8×10^{-5} M. Der Acyldonor lag in einer Endkonzentration von 4 mM, R-Insulin in einer Endkonzentration von 1 mM vor. Nach einer Reaktionszeit von insgesamt 25 min bei 30 °C erfolgte in einem ersten Reinigungsschritt die Abtrennung des Katalysators aus dem Reaktionsgemisch durch Ionenaustauschchromatographie an einem starken Anionenaustauscher (nach dem Reinigungsprotokoll für Trypsin-Varianten). Die RNase enthaltenden Fraktionen wurden zusammengefasst und gegen HEPES pH 7,5 dialysiert sowie aufkonzentriert (Centriprep, MW 3000). Bedingt durch die Aufreinigung sowie Aufkonzentrierung der Probe wurde in Kontrollversuchen ein Verlust an Protein (Rnase A/Abz-Lys(Bio)-Gly-RNase A) von durchschnittlich 12% (Wiederauffindungsrate von 88%) mit der Methode nach BRADFORD (1976) wie unter Pkt. 5.6.3. beschrieben bestimmt. In einem nachfolgenden Reinigungsschritt mit monomerem Avidin konnte das modifizierte Target isoliert werden. Die Konzentration der somit in Lösung vorliegenden modifizierten RNase A wurde spektrophotometrisch bestimmt, wobei für die Ausbeute der Markierungsreaktion unter Einbeziehung der Wiederauffindungsrate ein Wert von 8,7% ermittelt wurde.

5.6.2. Affinitätschromatographie mit monomerem Avidin

Als Säulenmaterial kam monomeres Avidin der Firma PIERCE zum Einsatz. Die Säule wurde zunächst mit 35 mM HEPES pH 7,5 gewaschen und anschließend zum Absättigen des tetrameren Avidins mit 2 mM D-Biotin in 35 mM HEPES pH 7,5 behandelt, wodurch die nichtreversiblen Biotinbindungsstellen blockiert werden. Nach erfolgter Equilibrierung der Säule mit HEPES-Puffer wurde die Probe tropfenweise aufgetragen. Das vollständige Einbringen der Probe in die Säule wurde durch Zugabe von 1,5 ml HEPES-Puffer sichergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei RT wurde ungebundenes Protein unter Verwendung von HEPES-Puffer von der Säule gewaschen. Das biotinylierte Protein ließ sich anschließend mit oben genannten Biotinpuffer eluieren. Reversible Bindungsstellen lassen sich durch Waschen mit einem Glycinpuffer (100 mM Glycin, pH 2,8) regenerieren. Mit Hilfe mehrerer SDS-Gele wurde ein Elutionsprofil erstellt (s. Abb. 24) und anschließend die Protein-enthaltenden Fraktionen mittels MALDI-TOF analysiert. Die Fraktionen mit ausschließlich markiertem Target wurden zusammengefasst und für weitere Untersuchungen verwendet.

5.6.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Präparationen bzw. die Ausbeute der Markierungsreaktion wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm unter Verwendung des literaturbekannten Extinktionskoeffizienten an einem UV/VIS-Photometer AGILENT 8453 bzw. nach der Methode von BRADFORD (1976) an einem Spektro-Photometer des Typs Novaspec[®] II (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Aufnahme der Eichkurve erfolgte anhand einer Ribonuklease A -Verdünnungsreihe zwischen 50 µg/ml und 1 mg/ml Protein. Es konnte festgestellt werden, daß beide Meßmethoden korrelieren.

5.6.4. Sequentieller Verdau der modifizierten RNase A

Der Verdau von Abz-Lys(Bio)-Gly-RNase A durch Subtilisin Carlsberg erfolgte in 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂ bei 30 °C für 0,5 min. Die Endkonzentration an modifiziertem Target betrug ca. 0,8 mM, die von Subtilisin 0,3 mM. Nach der Überführung des Reaktionsansatzes in eine Stopplösung (5 % TFA, 50% Methanol in Wasser) wurde das Reaktionsgemisch unter geeigneten Bedingungen HPLC-chromatographisch aufgetrennt und die Peptidfragmente aufgefangen. Das aus dem Verdau resultierende größere Peptidfragment konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen dem S-Protein zugeordnet werden (s. Abb. 26, 3b). Die Fraktion des kleineren Fragments wurde lyophilisiert und anschließend einem Verdau in 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl₂ mit Trypsin (1×10^{-9} M) bei 30 °C für 10 min unterzogen. Nach der Überführung des Proteolyseansatzes in eine Stopplösung (5 % TFA, 50% Methanol in Wasser) wurde das Reaktionsgemisch unter geeigneten Bedingungen HPLC-chromatographisch aufgetrennt und der Reaktionsverlauf bei 320 nm analysiert. Es konnte ein bei dieser Wellenlänge absorbierendes Fragment isoliert werden, welches anhand von nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen dem Abz-Lys(Bio)-Gly-Lys-OH Spaltprodukt zuzuordnen war.

5.6.5. RNase-A Aktivitätstest

Die Bestimmung der Aktivität der Abz-Lys(Bio)-Gly-modifizierten RNase A erforderte die Vorbereitung einer Probe mit ausschließlich modifiziertem Target bzw. einer

Probe mit ausschließlich unmodifizierter Ribonuklease, die als Referenz diente. Beide RNase Stammlösungen wurden gegen 0,1 M MES; 0,1M NaCl (pH 6,0) dialysiert und auf eine Konzentration von 9 μ M eingestellt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration beider Enzymlösungen erfolgte durch spektrophotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm. Dabei kann der Einfluß der Anthranilsäure-Gruppierung auf die Absorption des Gesamtproteins bei 280 nm auf Grund der spektralen Eigenschaften als nicht signifikant angenommen werden [GRAMMATICAKIS, 1951].

Der Aktivitätstest erfolgte in 0,1 M MES; 0,1M NaCl (pH 6,0) unter Verwendung des Standardsubstrates zyklisches Cytidin 2':3'-Monophosphat, das im Reaktionsansatz in einer Endkonzentration von 2 mM vorlag. Die Endkonzentration beider Katalysatoren im Meßansatz betrug je 0,45 μ M. Der Substratumsatz wurde bei einer Wellenlänge von 268 nm über einen geeigneten Zeitraum detektiert und ist in Abb. 27 graphisch dargestellt.

5.7. Moleküldynamische Berechnungen

Docking-Studien wurden mit Hilfe der Programme WHATIF, AUTODOCK 3.01 und QUANTA 98.1.1.1 durchgeführt. Grundlage der Trypsinvarianten ist die Röntgenstruktur von Ratten-Trypsin (RCSB Protein Data Bank, 3tgi). Die Mutationen wurden mit Hilfe des Programms WHATIF in die vorhandene Röntgenstruktur eingeführt. Lösungsmittelmoleküle und Ionen wurden vom Protein entfernt, polare Wasserstoffatome hinzugefügt und die Ladung mit Hilfe der QUANTA-Software korrigiert. Die unterschiedlichen Liganden wurden mit QUANTA nach dem gleichen Verfahren vorbereitet und für das Docking alle relevanten Torsionswinkel freigegeben. Es wurden pro Ligand 20 unabhängige Protein-Docking-Experimente in einem $70 \times 70 \times 95 \text{ \AA}^3$ Gitter mit dem Zentrum Ser-195 und einem grid spacing von 0,35 \AA durchgeführt. Die Produktivität der einzelnen Liganden wurde unter Berücksichtigung der Modellvorstellung zum katalytischen Mechanismus von Trypsin durch die relativen Abstände des Carbonyl-Sauerstoff und des Sauerstoff der zu spaltenden Esterbindung zum Gly¹⁹³ (Oxyanionloch) und zum katalytisch aktiven Ser¹⁹⁵ beurteilt.

6. Literaturverzeichnis

- Abrahamsen, L., Burnier, J., Butcher, K. A., Kossiakoff, A., Wells, J. A. (1991). **Biochemistry** **30**, 4151-4159.
- Affleck, R., Xu, Z.-F., Suzawa, V., Focht, K., Clark, D. S., Dordick, J. S. (1992). **Proc. Natl. Ac. Sci.** **89**, 1100-1104.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1990). **Molekularbiologie der Zelle**, (Übersetzung herausgegeben von L. Jaenicke) 2. Auflage, VCH Weinheim, S. 210-228.
- Antonini, E., Ascenzi, P., Bolognesi, M., Guarneri, M., Menegatti, E., and Amiconi, G. (1984). **Mol. Cell. Biochem.** **60**, 163-181.
- Arnold, F.H. & Chen, K. (1994). **Proc. Natl. Ac. Sci.** **90**, 5618-5622.
- Arnold, U., Hinderaker, M. P., and Raines, R.T. (2002). **The Scientific World Journal** **2**, 1823-1827.
- Arnold, U. and Ulbrich-Hofmann, R. (2001). **Eur. J. Biochem.** **268**, 93-97.
- Barrett, J. E., Lucero, C.M., Schultz, P. G. (1999). **J. Am. Chem. Soc.** **121**, 7965-7966.
- Bayer, E. A., Wilchek, M. (1990). **Methods in Enzymology** **184**, 138-160.
- Bayer, E. A., Zalis, M. G., Wilchek, M. (1985). **Anal. Biochem.** **149**, 529-536.
- Beaty, N. B. and Lane, M. D. (1982). **J. Biol. Chem.** **257**, 924-929.
- Berger, M. and Wood, H. G. (1975). **J. Biol. Chem.** **250**, 927-933.
- Bergmann, M., Fraenkel-Conrat, H. (1937). **J. Biol. Chem.** **119**, 707-720.
- Beveridge, A. J. (1996). **Protein Science** **5**, 1355-1365.
- Bizzozero, S. A., Baumann, W. K., Dutler, H. (1982). **Eur. J. Biochem.** **122**, 251-258.
- Björup, P., Torres, J. L., Adlercreutz, P., Clapes, P. (1998). **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **6**, 891-901.
- Bonnead, P. R., Grayear, T. P., Estell, D. A., Jones, J. B. (1991), **J. Am. Chem. Soc.** **30**, 4115-4119.
- Bordusa, F. (1997). **Dissertation**, Universität Leipzig
- Bordusa, F., Ullmann, D. und Jakubke, H.-D. (1997a), **Angew. Chem.** **109**, 1125-1127.
- Bordusa, F., Ullmann, D., Elsner, C. und Jakubke, H.-D. (1997b). **Angew. Chem.** **109**, 2583-2585.
- Bordusa, F. (2000). **Braz. J. Med. Biol. Res.** **33**, 469-485.
- Bordusa, F. (2002). **Chemical Reviews** **102**, 12, 4817-4867.
- Borgia, J. A. & Fields, G.B. (2000). **Trends in Biotechnologie** **18**, 243-251.

- Bradford, M. M. (1976). **Anal. Biochem.** **72**, 248-254.
- Brenner, M., Zimmermann, J. P., Wehrmüller, J., Quitt, P., Hartmann, A., Schneider, W. and Beglinger, U. (1957). **Helv Chim Acta** **40**, 1497-1517.
- Brünger, A. T., Huber, R., Karplus. M. (1987). **Biochemistry** **26**, 5153-5162.
- Butkiewicz, N.J., Yao, N., Wright-Minogue, J., Zhang, R., Ramanathan, L., Lau, J. Y. N., Hong, Z., Desmahapatra, B. (2000). **Biochem & Biophys Res Com** **276**, 278-282.
- Canne, L. E., Bark, S. J., Kent, S.B.H. (1996). **J. Am. Chem. Soc.** **118**, 5891-5896.
- Carter, P., Wells, J. A (1987). **Science** **237**, 394-399.
- Carter, P., Wells, J. A. (1988). **Nature** **332**, 564-568.
- Cerovsky, V., Wünsch, W., Brass, J. (1997). **Eur. J. Bioch.** **247**, 231-237.
- Cerovsky, V., Kockskämper, J., Glitsch, H. G. & Bordusa, F. (2000). **ChemBioChem** **2**, 126-129.
- Chapman-Smith, A., Cronan, E. Jr. (1999). **Trends in Biochemical Science** **24**, 359-363.
- Cleland, J. L., Craik, C. S. (1996). **Protein Engineering**, Principles and Practice, New York: Wiley & Sons., 518.
- Consler, T. G., Persson, B. L., Jung. H., Zen, K. H., Jung., K., Prive, G. G., Verner, G. E., Kaback, R., (1993). **Proc. Natl. Acad. Sci.** **90**, 6934-6938.
- Corey, D. R., Mc Grath, M. E., Vasquez, J. R., Fletterick, R. J., Craik, C. S. (1992). **J. Am. Chem. Soc.** **114**, 4906-4907.
- Corey, D. R., Craik, C. S. (1992). **J. Am. Chem. Soc.** **114**, 1784-1790.
- Cornish, V. W., Mendel, D., Schultz, P. G. (1995). **Angew. Chem. Int. Edit. Engl.** **34**, 621-633.
- Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T., Roczniak, S., Barr, P. J., Fletterick, R., Rutter, W.J. (1985). **Science** **228**, 291-297.
- Cronan, J. E., Jr. (1990). **J. Biol. Chem.** **265**, 10327-10333.
- Czapinska, H. and Otlewski, J. (1999). **Eur. J. Biochem** **260**, 571-595.
- Davis, B. G., Shang, X., De Santis, G., Bott, R. R., Jones, J. B. (1999). **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **7**, 2293-2301.
- Davis, B. G., Khumtaveeporn, K., Bott, R. R., Jones, J. B. (1999b). **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **7**, 2303-2311.
- Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S.B.H. (1994). **Science** **266**, 776-779.
- Dawson, P. E. & Kent, S. B. (2000). **Annu. Rev. Biochem.** **69**, 923-960.

- De Kreijl, A., van den Burg, B., Venema, G., Vriend, G., Eijssink, V. G. H. and Nielsen, J. E. (2002). **Journal of Biological Chemistry** **277** (18), 15432-15438.
- Dixon, G.H.; Go, S., Neurath, H. (1956). **Biochim. Biophys. Acta** **19**, 193-200.
- Doodsell, D. S., Morris, G. M., & Olson, A. J. (1996). **J. Mol. Recognit.** **9**, 1-5.
- Dominguez, A., Cabezas, N., Sanchez-Montero, Ü. M., Sinisterra, J. V. (1995). **Tetrahedron** **51**, 1827-1844.
- Elsner, C., Grahn, S., Bauer, S., Ullmann, D., Kurth, T. & Jakubke, H.-D. (2000). **J. Chem. Catal. B-Enzym.** **8**, 193-200.
- Elsner, C. (2000). **Dissertation**, Universität Leipzig
- Englebretsen, D. R., Garnham, B. C., Bergman, D. A., Alewood, P.F. (1995). **Tetrahedron Lett.** **36**, 8871-8874.
- Evans, T. C., Jr., Brenner, J., and Xu, M.Q. (1998). **Protein Science** **7**, 2256-2264.
- Fastrez, J., & Fersht, A. R. (1973). **Biochemistry** **12**, 1067-1074.
- Feihammer, H., Bode, W. & Huber, R. (1977). **J. Mol. Biol.** **111**, 415-438.
- Fersht, A. R., Blow, D. M. & Fastrez, J. (1973). **Biochemistry** **12**, 2035-2042
- Fersht, A. R. (1985). **Enzyme structure and mechanism**, W.H. Freeman and Co., New York.
- Fersht, A. R. (1995). **Enzyme structure and mechanism**, 2nd Ed., W.H. Freeman and Co., New York.
- Fiedler, F. (1987). **Eur. J. Biochem.** **163**, 303-312.
- Fischer, G. (1994). **Angew. Chemie Int. Ed. Engl.** **33**, 1415-1436.
- Freer, S. T., Kraut, J., Robertus, J. D., Wright, H. T., & Xuong, N. H. (1970). **Biochemistry** **9**, 1997-2009.
- Galat, A. (1993). **Eur. J. Biol. Chem.** **216**, 689-707.
- Gatos, D., Athanassopoulos, P., Tzavara, C., Barlos, K. (1999). in **Peptides 1998**, ed. S. Bajusz, F. Hudecz, pp. 146-148.
- Gertler, A., Walsh, K. A., & Neurath, H. (1974). **Biochemistry** **13**, 1302-1310.
- Gertler, A., Walsh, K. A., Neurath, H. (1973). **Biochemistry** **13**, 1302-1307.
- Glerum, D. M. and Tzagoloff, A. (1998). **Anal. Biochem.** **260**, 38-43.
- Goodsell, D. S., Morris, G. M., Olson, A. J. (1996). **J. Mol. Recognit.** **9**, 1-5.
- Graf, L., Craik, C. S., Patthy, A., Roczniak.S., Fletterick, R. J., Rutter, W.J. (1987). **Biochemistry** **26**, 2616-2623.
- Graf, L., Jancso, A., Szilagyi, L., Hegyi, G., Pinter, K., Naray-Szabo, G., Hepp, J., Medzihradzsky, K., Rutter, W. J. (1988). **PNAS** **85**, 4961-4965.

- Graf, L., Hegyi, G., Liko, I., Hepp, J., Medzihradzky, K., Craik, C. S., Rutter, W. J. (1988). **Int. Peptide Protein Res.** **32**, 512-518.
- Grammaticakis, P. (1951) **Bull. Soc. Chim. Fr.** **18**, 220-226
- Gravel, R. A. , Lam, K. F. , Mahuran, D., Kronis, A. (1980). **Arch. Biochem. Biophys.** **201**, 669-673.
- Grünberg, R. (1999). **Diplomarbeit**, Universität Leipzig
- Grünberg, R., Domgall, I., Günther, R., Rall, K., Hofmann, H.-J., Bordusa, F. (2000). **Eur. J. Biochem.** **267**, 1-8.
- Green, N. M., Toms, E.J. (1973). **Biochem J.** **133**, 687-698.
- Green, N. M. (1975). **Adv. Protein Chem.** **29**, 85-133.
- Greer, J. (1990). **Proteins: Struct. Funct. Genet.** **7**, 317-334.
- Guchhait, R. B., Polakis, S. E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J. and Lane, M. D. (1974). **J. Biol. Chem.** **49**, 6633-6645.
- Günther, R. (1998). **Diplomarbeit**, Universität Leipzig
- Günther, R., Thust, S., Hofmann, H.-J., Bordusa, F. (2000a). **Eur. J. Biochem.** **267**, 3496-3501.
- Günther, R. & Bordusa, F. (2000). **Chem. Eur. J.** **6** (3), 463-467.
- Gutte, B. & Merrifield, B. (1971). **Am. J. Biol. Chem.** **246**, 1722-1741.
- Hackeng, T. M., Griffin, J. H., Dawson, P. E. (1999). **PNAS** **96**, 10068-10073.
- Hacker, J. and Fischer, G. (1993). **Mol Microbiol** **10**, 445-456.
- Hecht, S. M. (1992). **Acc. Chem. Res.** **25**, 545-552.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L., & Rutter, W. J. (1992). **Science** **255**, 1249-1253.
- Hedstrom, L., Perona, J., & Rutter, W. J., (1994a). **Biochemistry** **33**, 8757-8763.
- Hedstrom, L., Farr-Jones, S., Kettner, C. A., & Rutter, W. J. (1994b). **Biochemistry** **33**, 8764-8769.
- Hedstrom, L., Lin, T. Y. and Fast, W. (1996). **Biochemistry** **35**, 4515-4523.
- Hedstrom, L. (1996a). **Biol. Chem.** **377**, 465-470.
- Hemenway, C. and Heitman, J. (1993). **Ann NY Acad Sci** **696**, 38-46.
- Henrickson, K. P., Allen, S. H. G. and Maloy, W.L. (1979). **Anal. Biochem.** **94**, 366-370.
- Higaki, J. N., Haymore, B. L., Chen, S., Fletterick, R. J., Craik, C. S. (1990). **Biochemistry** **29**, 8582-8586.
- Higaki, J. N., Evnin, L. B., Craik, C. S. (1989). **Biochemistry** **28**, 9256-9263.

- Hondal, R. J., Nilsson, B. L., and Raines, R. T. (2001). **J. Am. Chem. Soc.** **123**, 5140-5141.
- Huber, R., & Bode, W. (1978). **Acc. Chem. Res.** **11**, 114-122.
- Hung, S. H., Hedstrom, L. (1998). **Protein Engineering** **11**(8), 669-673.
- Itoh, K., Sekizaki, H., Toyota, E., Fujiwara, N., Tanizawa, K. (1996). **Bioorganic Chemistry** **24**, 59-68.
- Itoh, K., Sekizaki, H., Toyota, E., Tanizawa, K. (1997). **Bioorg. Chem.** **25**, 307-314.
- Jackson, D. J., Burnier, J., Quan, C., Stanlay, M., Tom, J., Wells, J. A. (1994). **Science** **266**, 243-247.
- Jakubke, H.-D., Kuhl, P. und Könnecke, A. (1985). **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **24**, 85-93.
- Jakubke, H.-D. (1987). in **The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology** (Udenfried, S. und Meienhofer, J. Hrsg., Academic Press, New York) Bd. 9, 103-165.
- Jakubke, H.-D. (1994). **J. Chin. Chem. Soc.** **41**, 355-370.
- Jakubke, H.-D., Eichhorn, U., Hänslar, M., Ullmann, D. (1996). **Biol. Chem.** **377**, 455-464.
- Jakubke, H.-D. (1996). **Peptide**, Chemie und Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Janssen, A.E.M. & Halling, P. J. (1994). **J. Am. Chem. Soc.** **116**, 9827-9830.
- Kahne, D. & Still, W. C. (1988). **J. Am. Chem. Soc.** **110**, 7259-7534.
- Kasche, V. (1989). in **Proteolytic Enzymes: a practical approach** (Beynon, R.J. und Bond, J.S. Hrsg., IRL Pre), 125-143ss.
- Kuhl, P., Zacharias, U., Burckhardt, H., & Jakubke, H.-D. (1986). **Monatshefte für Chemie** **117**, 893-896.
- Kent, S. B. H. (1980). in **Biomedical Polymers** (Goödberg, E.P. and Nakajima, A. eds. Academic Press.) pp. 213-242.
- Kent, S. B. H. (1988). **Annu. Rev. Biochem.** **57**, 957-984.
- Kerr, M. A., Walsh, K. A., & Neurath, H. (1975). **Biochemistry** **15**, 5088-5094.
- Khoury, H. F., Vernet, T., Menard, R., Parlati, F., Laflamme, P., Tessier, D.C., Goursalin, B., Thomas, P. Y., Storer, A. C. (1991). **Biochemistry** **30**, 8929-8934.
- Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. A., and Bertozzi, C. R. (2002). **PNAS** **99**, 19-24.
- Kiyam, S., Fujii, N., Yajima, H., Moriga, M., Takagi, A. (1984). **Int. J. Pept. Protein Res.** **23**, 174-186.

- Kockskämper, J., Sendhoff, K., Erenkamp, S., Bordusa, F., Cerovsky, V. and Glitsch, H.G. (2001). **Pflügers Arch-Eur. J. Physiol.** **441**, 807-815.
- Kossiakoff, A. A., Chambers, J. L., Kay, L. M. & Stroud, R. M. (1977). **Biochemistry** **16**, 654-664.
- Könnecke, A., Schellenberger, V., Hofmann, H.-J. & Jakubke, H.-D. (1984). **Pharmazie** **3**, 785-786
- Kraut, J. (1977). **Annu. Rev. Biochem.** **46**, 331-358.
- Krieger, M., Kay, L. M., & Stroud, R.M. (1974). **J. Mol. Biol.** **83**, 209-230.
- Kullmann, W. (1987). **Enzymatic Peptide Synthesis**, CRC Press. Inc. Boca Raton
- Kurth, T. (1998). **Dissertation**, Universität Leipzig
- Kurth, T., Grahn, S., Thormann, M., Ullmann, D., Hofmann, H.-J., Jakubke, H.-D. & Hedstrom, L. (1998). **Biochemistry** **37**, 11434-11440.
- Kurth, T., Ullmann, D., Jakubke, H.-D. & Hedstrom, L. (1997). **Biochemistry** **36**, 10098-10104.
- Lemke, U. (2001). Projektarbeit, Universität leipzig.
- Liao, D., Breddam, K., Sweet, R. M., Bullock, T., Remington, S. J. (1992). **Biochemistry** **31**, 9796-9812.
- Liu, C. F., Tarn, J. P. (1994). **J.Am. Chem. Soc.** **116**, 4149-4153.
- Liu, C. F., Rao, C., Tarn, J. P. (1996). **J. Am. Chem. Soc.** **118**, 307-312.
- Mao, S. Y. (1999). **Methods Mol. Biol.** **115**, 39-41.
- Markert, Y., Köditz, J., Mansfeld, J., Arnold, U. and Ulbrich-Hofmann,R. (2001). **Protein Engineering** **14**, 791-796.
- Markwardt, F., Walsmann, P., Stürzebecher, J., Landmann,H., & Wagner, G. (1973). **Pharmazie** **28**, 326-330.
- Mc Grath, M. E., Wilke, M. E., Higaki, J. N., Craik, C. S., Fletterick, R. J. (1989). **Biochemistry** **28**, 9264-92-70.
- Mc Grath, M. E., Haymore, B. L., Summers, N. L., Craik, C. S., Fletterick, R. J. (1993). **Biochemistry** **32**, 1914-1919.
- Mc Rae, B. J., Kurachi, K., Heimark, R. L., Fujikawa, K., Davie, E. W., & Powers, J. C. (1981). **Biochemistry** **20**, 7196-7206.
- Mendel, D., Cornish, V. W., Schultz, P. G. (1995). **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** **24**, 435-462.
- Metthews, B. W. (1993). **Annu. Rev. Biochem.** **62**, 139-160.

- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., Teller, E. (1953). **J. Chem. Phys.** **21**, 1087-1091.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., Olson, A. J. (1996). **J. Comput. Aid. Mol. Des.** **10**, 293-304.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. (1998). **J. Comput. Chem.** **19**, 1639-1662.
- Muir, T. W., Sondhi, D., Cole, P. A. (1998). **PNAS** **95**, 6705-6710.
- Muir, T. W. (2001). **Synlett** **6**, 733-740.
- Müller, N., Bordusa, F. (2000). **Analytical Biochemistry** **286**, 86-90.
- Murtif, V. L., Bahler, C. R., Samols, D. (1985). **PNAS** **82**, 5617-5621.
- Navia, M. A., McKeever, B. M., Springer, J. P., Lin, T.-Y., Williams, H. R., Fluder, E. M., Dorn, C. P., & Hoogsteen, K. (1989). **PNAS** **86**, 7-11.
- Nenci, A., Gotte, G., Maras, B., Libonati, M. (2001). **Biochim. Biophys. Acta** **1545**, 255-262.
- Neurath, M. (1975). in **Proteases and Biological Control**, p. 51. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1975.
- Nilsson, B. L., Kiessling, L. L., Raines, R. T. (2000). **Org. Lett.** **2**, 1939-1941.
- O'Shannessy, D. J. (1990). **Methods in Enzymologie** **184**, 162-164.
- Offer, J., Dawson, P. E. (2000). **Org. Lett.** **2**, 23-26.
- Ohno, K., Levin, B., Meruelo, D. (1996). **Biochem. Mol. Med.** **58**, 227-233.
- Pál, G., Santamaria, F., Kossiakoff, A. A., Lu, W. (2003). **Protein Expression and Purification** **29**, 185-192.
- Parrott, M. B. and Barry, M. A. (1999). **Molecular Therapy** **1**(1), 96-104.
- Parrott, M. B. and Barry, M. A. (2001). **Biochem. Biophys. Res. Com.** **281**, 993-1000.
- Pasternak, A., Liu, X., Lin, T.-Y. and Hedstrom, L. (1998). **Biochemistry** **37**, 16201-16210.
- Perona, J. J., Tsu, C. A., Craik, C. S., & Fletterick, R. J. (1993). **J. Mol. Biol.** **230**, 934-949.
- Perona, J. J., Hedstrom, L., Wagner, R., Rutter, W. J., Craik, C. S., & Fletterick, R. J. (1994). **Biochemistry** **33**, 3252-3259.
- Perona, J. J., Hedstrom, L., Rutter, W. J., Fletterick, R. (1995). **Biochemistry** **34**, 1489-1499.
- Perona, J. J. & Craik, C. S. (1995). **Protein Science** **4**, 337-360.
- Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K., Fischer, G. (1994a). **FEBS Lett** **343**, 65-69.

- Rahfeld, J. U., Rücknagel, K. P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K., and Fischer, G. (1994b). **FEBS Lett** **352**, 180-184.
- Rall, K. & Bordusa, F. (2002). **J. Org. Chem.** **67**, 9103-9106.
- Remington, S. J., Woodbury, R. G., Reynolds, R. A., Matthews, B. W. and Neurath, H. (1988). **Biochemistry** **27**, 8097-8105.
- Robertus, J. D., Kraut, J., Alden, R. A., Birktoft, J. J. (1972). **Biochemistry** **11**, 4293-4303
- Rose, K. (1994). **J. Am. Chem. Soc.** **116**, 30-33.
- Sakakibara, S. (1995). **Biopolymers** **37**, 17-28.
- Samols, D., Thronton, G. G., Murtif, V. L., Kumar, G. K., Haase, F. C., Wood, H. G. (1988). **J. Biol. Chem.** **263**, 6461-6464.
- Saviranta, P., Haavisto, T., Rappu, P., Karp, M., Lövgren, T. (1998). **Bioconjugat Chem.** **9**, 725-735.
- Saxon, E. and Bertozzi, C.R. (2000). **Science** **287**, 2007-2010.
- Schelbert, B. (1998). **Dissertation**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Schellenberger, V. (1990). **Dissertation B**, Universität Leipzig
- Schellenberger, V., Schellenberger, U., Mitin, Y.V., & Jakubke, H.-D. (1990). **Eur. J. Biochem.** **187**, 163-167.
- Schellenberger, V., & Jakubke, H.-D. (1991). **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **30**, 1437-1449.
- Schellenberger, V., Schellenberger, U., & Jakubke, H.-D. (1991). **Biotech Bioeng** **38**, 319-321.
- Schellenberger, V., Turck, C. W., Hedstrom, L., Rutter, W. J. (1993). **Biochemistry** **32**, 4349-4353.
- Schellenberger, V., Turck, C.W., & Rutter, W. J. (1994). **Biochemistry** **33**, 4251-4257.
- Schnölzer, M., Kent, S.B.H. (1992). **Science** **256**, 221-225.
- Schwarz, A., Wandrey, C., Bayer, E. A., Wilchek, M. (1990). **Methods in Enzymologie** **184**, 160-162.
- Sears, P., Schuster, M., Wang, P., Witte.K. & Wong, C.-H. (1994). **J. Am. Chem. Soc.** **116**, 6521-6530.
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E., & Tanizawa, K. (1996). **Chem Pharm Bull** **44**, 1577-1579.
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E., & Tanizawa, K. (1997). **Tetrahedron Letters** **38**, 1777-1780.

- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E., & Tanizawa, K. (1998). **Chem Pharm Bull** **46**, 846-849.
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E., & Tanizawa, K. (1999a). **Chem Pharm Bull** **47** 913-916.
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E., & Tanizawa, K. (1999b). **Amino Acids** **17**, 285-288.
- Sekizaki, H., Itoh, K., Murakami, M., Toyota, E., Tanizawa, K. (2000). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** **127**, 337-246.
- Sichler, K., Hopfner, K.-P., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W., Brandstetter, H. (2002). **FEBS Letters** **530**, 220-224.
- Smith, J. S., Keller, J. R., Lohrey, N. C., McCauslin, C. S., Ortiz, M., Cowan, K., Spence, S. E. (1999). **PNAS** **96**, 8855-8860.
- Smith, M. (1994). **Angew. Chem. Int. Edit. Engl.** **33**, 1214-1221.
- Szabo, E., Böcskei, Z., Naray-Szabo, G., Graf, L. (1999). **Eur. J. Biochem.** **263**, 20-26.
- Tam, J. P., Yu, Q., Miao, Z. (1999). **Biopolymers (Peptide Science)** **51**, 311-332.
- Tam, J. P., Xu, J., Eom, K. D. (2001). **Biopolymers (Peptide Science)** **60**, 194-205.
- Thampy, K. G., Huang, W. Y., Wakil, S. J. (1988). **Arch. Biochem. Biophys.** **266**, 270-276.
- Thormann, M., Thust, S., Hofmann, H.-J., & Bordusa, F. (1999). **Biochemistry** **38**(19), 6056-6062.
- Trandinh, C. C., Pao, G. M. and Saier Jr., M. H. (1992). **FASEB J** **6**, 3410-3420.
- Ullmann, D., & Jakubke, H.-D. (1994). **Eur. J. Biochem.** **223**, 865-872.
- Ullmann, D., Salchert, K., Bordusa, F., Schaaf, R., Jakubke, H.-D. (1994). in **Proc. 5th Akabori Conference**, Wunsch, E., Ed., R&J. Blank: Munich, pp 70-75.
- van't Hoff, J. H. (1898). **Z. Anorg. Chem.** **18**, 1-13.
- Varallyay, E., Lengyel, Z., Graf, L. and Szilagyi, L. (1997). **Bioch. And Biophys. Res. Comm.** **230**, 592-596.
- Wang, E. C. W., Hung, S.-H., Cahoon, M. and Hedstrom, L. (1997). **Protein Engineering** **10**(4), 405-411.
- Walsh, K. A., & Wilcox, B.E. (1970). **Methods in Enzymol.** **19**, 31-69.
- Wagner, G., Vieweg, H. & Kühmstedt, H. (1973). **Pharmazie** **28**, 288-292, 293-296.
- Wagner, G. & Hörn, H. (1973). **Pharmazie** **28**, 427-431.
- Watson, H.C., Shotton, D.M., Cox, C.J. & Muirhead, H. (1970). **Nature** **225**, 806.
- Wehofsky, N. & Bordusa, F. (1998). **FEBS Letters** **443**, 220-224.

- Wehofsky, N., Wissmann, J.-D., Ahlisch, M., Bordusa, F. (2000). **Biochim. et Biophys. Acta** **1479**, 114-118.
- Wehofsky, N. (2000). **Dissertation**, Universität Leipzig
- Wehofsky, N., Löser, R., Buchynskyy, A., Welzel, P., Bordusa, F. (2002). **Angew. Chem. Int. Ed.** **41**, 2735-2738.
- West, J. B., Schölten, J., Stolowich, N. J., Hogg, J. L., Scott, A. I., Wong, C.-H. (1990). **J. Am. Chem. Soc.** **110**, 3709-3710.
- West, J. B., Hennen, W. J., Bibbs, J. A., Lalonde, J. L., Zhong, Z., Meyer, B. H., Wong, C.H. (1990). **J. Am. Chem. Soc.** **112**, 5313.
- Wieland, T., Bolkelmann, E., Bauer, L., Lang, H. U., and Lau, H. (1953). **Liebigs. Ann. Chem.** **583**, 129-149.
- Wilchek, M. & Bayer, E. A. (1988). **Anal. Biochem.** **171**, 1-32.
- Wilchek, M. & Bayer, E. A. (1990). **Methods Enzymologie** **184**, 5-13.
- Wilchek, M. & Bayer, E. A. (1990). **Methods Enzymologie** **184**, 14-45.
- Wilke, M. E., Higaki, J. N., Craik, C. S., & Fletterick, R. J. (1991). **J. Mol. Biol.** **219**, 525-532
- Willet, W. S., Brinen, L. S., Fletterick, R. J., & Craik, C. S. (1996). **Biochemistry** **35**, 5992-5998.
- Wong, C.-H. (1993). **Chimia** **47**, 127-132.
- Wong, C.-H. (1989). **Science** **244**, 1145-1152.
- Xu, S., Rall, K., Bordusa, F. (2001). **J. Org. Chem.** **66**, 1627-1632.
- Zhong, Z., Bibbs, J. A., Yuan, W., Wong, C.H. (1991). **J. Am. Chem. Soc.** **113**, 259.
- Zhong, Z., Liu, J. L.-C., Dinterman, L. M., Finkelman, M. A. J., Mueller, W. T., Rollence, M. L., Whitlow, M., Wong, C.-H. (1991). **J. Am. Chem. Soc.** **113**, 683-684.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die durch praktische, ideelle sowie materielle Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. G. Fischer für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen bedanken.

Meinem Betreuer Herrn Dr. F. Bordusa danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen sowie das ständige Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein Dank gilt weiter der ehemaligen Arbeitsgruppe von Herrn Prof. H.-D. Jakubke, insbesondere Herrn Dr. T. Kurth und Herrn Dr. D. Ullmann für die Einarbeitung in die Herstellung und Reinigung von Trypsin-Varianten sowie die freundliche Überlassung von Plasmidkonstrukten.

Herrn Prof. H.-J. Hofmann, Herrn Dr. R. Günther sowie Frau Dipl. Biochem. U. Lemke danke ich für die Durchführung moleküldynamischer Berechnungen.

Bei Herrn Dipl. Biochem. D. Wildemann und Frau B. Höckelmann sowie Frau Dr. N. Wehofskey möchte ich mich recht herzlich für die Überlassung von Substratmimetika zur selektiv *N*-terminalen Modifizierung von Peptiden und Proteinen bedanken.

Frau Dr. A. Schierhorn, Frau K. Walther, Frau P. Gersching, Herrn Dr. D. Haferburg sowie Frau R. Schaaf danke ich für die Aufnahme von Massenspektren.

Mein Dank gilt weiter der ehemaligen Arbeitsgruppe von Herrn Prof. U. Hahn für die Unterstützung der molekularbiologischen Arbeiten in Leipzig, insbesondere Frau B. Wolff für die durchgeführten DNA-Sequenzierungen der Trypsin-Varianten.

Den früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Nichtkonventionelle Biokatalyse“ sowie allen Mitarbeitern der Max Planck Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, insbesondere Frau I. Hamann für die praktische Unterstützung der experimentellen Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Thomas, meinen Kindern Rebecca und Lennart, meinen Eltern und Schwiegereltern sowie allen Freunden für die stets gewährte moralische Unterstützung, die nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Textstellen als solche kenntlich gemacht habe. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Promotion eingereicht.

Dessau, den 07.04.2004

Kathrin Rall

LEBENS LAUF

Name Kathrin Rall, geb. Stabe
Geburtsdatum/-ort 27.01.1971 in Dessau
Nationalität deutsch
Familienstand verheiratet, 2 Kinder

*Schulische/
berufliche Ausbildung* 1977-1987 Grundschule Dessau
Schule mit erweitertem Russischunterricht

1987-1989 Berufsausbildung im Impfstoffwerk
Dessau-Tornau, Abschluß Biologielaborantin

1989-1991 Abendgymnasium Dessau, Abitur

Berufstätigkeit 1989 - 1992 Biologielaborantin im Impfstoffwerk Dessau
Tornau GmbH

Studium 1992-1997 Fachrichtung: Biologie, Universität Leipzig bzw.
Universität Halle-Wittenberg
Abschluß mit Diplomarbeit im Fachbereich Mikrobiologie der
Universität Leipzig
Thema: „Untersuchungen zur mikrobiellen Biotransformation
von 1-(2Mercaptoethyl)-chinazolin-2,4
(1H,3H)-dion durch ausgesuchte Pilzstämmen“
Betreuer: PD Dr. Tauchert

*Studienbegleitende
Tätigkeiten* 1994-1996 Betreuung des mikrobiologischen Praktikums
im Grundstudium (Fachbereich Mikrobiologie, Universität
Leipzig)

08-09/95 Praktikum im Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle
GmbH, (Mikrobiologische Begleituntersuchungen zu
Pilotversuchen des Sanierungsvorhabens Schwelvollert)

Promotionsstudium 1997-1999 Institut für Biochemie Universität Leipzig,
AG „Nichtkonventionelle Biokatalyse“
2000-2004 Max Planck Forschungsstelle „Enzymologie der
Proteinfaltung“ (Halle/Saale)
Thema: „Untersuchungen zur Optimierung der Serinprotease
Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte
Peptidsynthese“,
Betreuer: Dr. F. Bordusa

Elternzeit Okt. 1998 – Mär. 1999, Apr. 2001 – Okt. 2001