

Semi-rationales Enzymdesign zur Optimierung der Trypsiligase

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn Dipl. Biochem. René Wartner

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Frank Bordusa
- 2. Prof. Dr. Ralph Golbik
- 3. Prof. Dr. Dirk Schwarzer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18. November 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Enzym-Engineering	3
1.2 Methodenspektrum im Bibliotheksdesign	5
1.3 Selektion und Screening	9
1.4 Phagen-Display zur Selektion enzymatischer Aktivität	16
1.5 Trypsilgase	23
1.6 Ortsspezifische Proteinmodifikation und ADCs	27
1.7 Zielstellung	30
2 Material	32
2.1 Chemikalien	32
2.2 Oligonukleotide	32
2.3 Plasmide	33
2.4 Mikroorganismen und Bakteriophagen	34
2.5 Nährmedien	35
2.6 Enzyme und Proteine	36
2.7 Referenzstandards, Kits und Reagenzien	37
2.8 Peptide	38
2.9 Puffer und Lösungen	39
2.10 Sonstige Materialien	41
2.11 Geräte	42
3 Methoden	44
3.1 Molekularbiologische Methoden	44
3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	44
3.1.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>P. pastoris</i> -Zellen	44
3.1.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	44
3.1.4 Synthese doppelsträngiger DNA mittels Klenow-Fragment	44
3.1.5 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten oder Plasmiden	45
3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	45
3.1.7 Megaprimer-Mutagenese	45
3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA	46
3.1.9 Aufreinigung und Entsalzen von DNA-Lösungen	46
3.1.10 Bestimmung der DNA-Konzentration	47
3.1.11 DNA-Sequenzierung	47
3.2 Mikrobiologische Methoden	47
3.2.1 Transformation von <i>E. coli</i>	47
3.2.2 Biosynthese rekombinanter Fab-Fragmente in <i>E. coli</i>	48
3.2.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>P. pastoris</i> X33	48

Inhaltsverzeichnis

3.2.4	Biosynthese von Trypsiligase-Varianten in <i>P. pastoris</i> X33	48
3.3	Proteinbiochemische Methoden	49
3.3.1	Chromatografische Reinigung der Fab-Fragmente	49
3.3.2	Chromatografische Reinigung der Trypsiligase-Varianten	50
3.3.3	Bestimmung der Protein-Konzentration	51
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.3.5	LC/MS-Analytik von Proteinen	52
3.4	Selektion mittels M13-Phagen-Display	52
3.4.1	Propagierung Trypsiligase-präsentierender Phagen	53
3.4.2	Selektion und Anreicherung optimierter Varianten	54
3.4.3	Reinfektion von <i>E. coli</i> ER2738 und Phagentiter-Bestimmung	55
3.5	ELISA-basiertes Screening im Hochdurchsatz-Format	56
3.5.1	Biosynthese von Trypsiligase im MTP-Format	56
3.5.2	Aktivitätsnachweis für Trypsiligase mittels ELISA	57
3.5.3	Biosynthese von Einzelvarianten im MTP-Format	58
3.5.4	ELISA-basiertes Screening	59
3.6	Charakterisierung optimierter Trypsiligase-Varianten	60
3.6.1	Transamidierungsstudien	60
3.6.2	Hydrolysestudien	61
3.6.3	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat}	62
3.6.4	Studien zur Zinkionen-Abhängigkeit	62
3.6.5	Studien zur pH-Abhängigkeit	63
3.7	C-terminale Modifikation des αHer2-Fab-Fragments	63
3.8	Funktionsanalyse der modifizierten Fab-Fragmente mittels ELISA	64
3.9	Statistik und Fehlerangaben	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Generierung der randomisierten DNA-Bibliothek	66
4.1.1	Bibliotheksdesign basierend auf Trypsiligase	66
4.1.2	Herstellung und Qualitätskontrolle der DNA-Bibliothek	68
4.2	Selektion optimierter Varianten mittels Phagen-Display	72
4.3	Screening zur Identifikation optimierter Varianten	73
4.3.1	Validierung der Biosynthese von Trypsiligase im MTP-Format	73
4.3.2	Screening im Hochdurchsatz-Format	75
4.4	Primäre Charakterisierung identifizierter Trypsiligase-Varianten	78
4.4.1	Sequenzierung der identifizierten Varianten	78

Inhaltsverzeichnis

4.4.2 Rekombinante Herstellung der identifizierten Varianten	79
4.4.3 Transamidierungsstudien anhand der identifizierten Varianten	82
4.5 Studien zur Erkennungssequenz der Varianten 1C11 und 4F8	83
4.6 Detaillierte Charakterisierung der Variante 1C11	87
4.6.1 Bestimmung von K_M und k_{cat} für die Transamidierungsreaktion	88
4.6.2 Studien zur Syntheseeffizienz der Variante 1C11	90
4.6.3 Einfluss der Zinkionen-Konzentration auf die Transamidierung	92
4.6.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Transamidierung	93
4.7 Modifikation des αHer2-Fab-Fragments mittels 1C11	95
4.7.1 Biosynthese und Reinigung der Fab-Fragmente	95
4.7.2 Transamidierungsstudien unter Verwendung der Fab-Fragmente	98
4.7.3 Analyse der Funktionalität modifizierter Fab-Fragmente mittels ELISA	101
5 Diskussion	103
5.1 Design und Qualität der Trypsiligase-basierten Bibliothek	103
5.2 Selektion und Screening potentiell optimierter Varianten	107
5.3 Herstellung und primäre Charakterisierung identifizierter Varianten	111
5.4 Präferierte Erkennungssequenz der optimierten Varianten 1C11 und 4F8	117
5.5 Detaillierte enzymkinetische Charakterisierung der Variante 1C11	121
5.6 Validierung der praktischen Anwendbarkeit von Variante 1C11	130
6 Zusammenfassung und Ausblick	135
7 Literaturverzeichnis	138
Danksagung	156
Lebenslauf	158
Publikationsliste	159
Eidesstattliche Erklärung	160

Abkürzungsverzeichnis

Die Namen der Aminosäuren wurden entsprechend der Vorschläge für Ein- und Dreibuchstabencodierung der IUPAC-IUB-Kommission (“Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (Recommendations 1983),” 1984) abgekürzt.

abs.	absolut
ADC	<i>antibody-drug conjugate</i>
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid
AK	Antikörper
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
BMD	<i>buffered minimal dextrose media</i>
BMM	<i>buffered minimal methanol media</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bz	Benzoylgruppe
cfu	<i>colony-forming unit</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase

Abkürzungsverzeichnis

IEX	Ionenaustausch-Chromatografie
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBLS	<i>lysogeny broth low salt</i>
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PDA	<i>photodiode array</i>
PEG	Polyethylenglycol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pol.	Polymerase
Q-TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometrie mit Quadrupol-Filter
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschluss-Chromatografie
sfGFP	<i>superfolder green fluorescent protein</i>
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
UV/VIS	ultraviolett/sichtbar
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose media</i>
YPDS	<i>yeast extract peptone dextrose sorbitol media</i>

1 Einleitung

Biokatalysatoren bzw. Enzyme werden von der Menschheit bereits seit Jahrtausenden für biotechnologische Herstellungsprozesse verwendet. Archäologische Funde belegten, dass bereits vor ca. 13.000 Jahren Bier gebraut wurde (L. Liu et al., 2018), womit diese Produktion eines Lebensmittels als die älteste nachgewiesene Anwendung von Enzymen anzusehen ist. Ein weiteres Beispiel ist die Herstellung von Käse, wofür ebenfalls Enzyme in Form von Lab verwendet werden. In der Region Kujawien (Polen) wurden mit ca. 7.500 Jahren die ältesten Hinweise für die Käseherstellung gefunden (Salque et al., 2013). Jedoch war den Menschen damals natürlich nicht bewusst, dass Enzyme die treibende Kraft hinter diesen Prozessen sind. Erst im Jahr 1876 wurde der Begriff „Enzym“ durch den deutschen Physiologen Wilhelm Friedrich Kühne geprägt. Dieser Umstand ist auf seine Arbeiten mit dem Verdauungsenzym Trypsin zurückzuführen, welches er ebenfalls benannte (Kühne, 1876). Die Entdeckung der zellfreien Fermentation durch den deutschen Chemiker Eduard Buchner im Jahre 1897 war ein bedeutender wissenschaftlicher Meilenstein auf dem Weg zur modernen Enzymologie. Er konnte beweisen, dass Gärungsprozesse auch ohne lebende Zellen möglich sind, indem er Hefezellen mit Sand zermahlte und den durch Auspressen gewonnenen Saft mit Saccharose-Lösung versetzte. Die dabei entstehende Gasbildung führte er auf die im Zellsaft enthaltene „Zymase“ zurück (Buchner, 1897). Für diese Entdeckung erhielt Buchner 1907 den Nobelpreis für Chemie.

Ein früher Pionier der industriellen Anwendung von Enzymen war der deutsche Chemiker und Unternehmer Otto Röhm. Die traditionelle Lederherstellung bedingte den Einsatz von Hundekot für die Lederbeize, was nicht nur den Berufsstand des Gerbers in ein schlechtes Licht rückte, sondern auch zu inkonsistenten Ergebnissen führte. Röhm vermutete, dass Verdauungsenzyme im Hundekot für die Beize verantwortlich waren und schlussfolgerte, dass stattdessen ein Pankreas-Extrakt verwendet werden könnte. Also testete er solche Extrakte, welche hauptsächlich Trypsin enthalten, mit positivem Ergebnis und meldete seine Erfindung zum Patent an (Röhm, 1908). Im Jahr 1907 gründete er zusammen mit dem Kaufmann Otto Haas das Unternehmen Röhm & Haas, welches den Pankreas-Extrakt unter dem Markennamen OROPON® herstellte und vertrieb. Der große

wirtschaftliche Erfolg führte zur Gründung einer Niederlassung in den USA und zur Entwicklung weiterer Enzym-basierter Produkte wie BURNUS®, welches in der Waschmittelindustrie Anwendung fand.

Heutzutage werden Enzyme für eine Vielzahl von Herstellungsprozessen diverser Produkte eingesetzt. Darunter fallen auch zahlreiche Produkte, mit denen wir im täglichen Leben in Kontakt kommen. Hier seien beispielhaft Industriezweige wie die Lebensmittel-, Futtermittel-, Textil-/Leder-, Waschmittel-, Papier- und Biokraftstoff-Industrie genannt (Aehle, 2007; Kirk et al., 2002). Aber auch in der chemischen und pharmazeutischen Industrie wird der Bedarf an effizienten Biokatalysatoren immer größer (Huisman & Gray, 2002; Tao et al., 2009). Der Grund hierfür liegt primär in den intrinsischen Eigenschaften, welche Enzyme mit sich bringen. Aus diesen Eigenschaften erwachsen die folgenden und wesentlichen Vorteile, welche bei der Anwendung von Enzymen ausgenutzt werden sollen:

- 1) Chemo-, Regio- und Stereoselektivität,
- 2) hohe Aktivität,
- 3) milde Reaktionsbedingungen,
- 4) Ressourcen schonend,
- 5) Umweltverträglichkeit.

So ermöglicht die Chemo- und Regioselektivität von Enzymen die Synthese komplexer Moleküle ohne den Einsatz von Schutzgruppen. Zudem macht die hohe Stereoselektivität die Synthese enantiomerenreiner Wirkstoffe zugänglich, was in der pharmazeutischen Industrie zunehmend an Bedeutung gewinnt (Rasor & Voss, 2001; Thomas et al., 2002). Die hohe Aktivität der meisten Enzyme macht diese zu äußerst effizienten Katalysatoren und erlaubt so auch den Einsatz deutlich geringerer Konzentrationen, als es z.B. bei chemischen Katalysatoren üblich ist (Wolfenden & Snider, 2001). Hinsichtlich Prozessparametern wie Temperatur, pH-Wert und Druck ermöglichen Enzyme außerdem sehr milde Reaktionsbedingungen, was das Auftreten unerwünschter Nebenreaktionen minimieren kann (Faber, 2018). Angesichts des drohenden bzw. bereits existenten Klimawandels rückt auch in der verarbeitenden Industrie die Einsparung von Ressourcen und Energie immer mehr in den Fokus. Dieses Bestreben führte zur Konzeption der „Grünen Chemie“ und zur Formulierung von zwölf Grundprinzipien (Anastas &

Warner, 1998). Die Verwendung von Biokatalysatoren adressiert hierbei viele dieser Grundprinzipien. Durch die Chemo-, Regio- und Stereoselektivität von Enzymen wird bei deren Verwendung die notwendige Anzahl an Syntheseschritten in einem Herstellungsprozess häufig reduziert. Zudem sind aufgrund der milden Reaktionsbedingungen geringere Temperaturen und Drücke ausreichend, während zusätzlich der Einsatz organischer Lösungsmittel reduziert wird. Nicht zuletzt sind Enzyme im Vergleich zu chemischen Katalysatoren in der Regel nicht toxisch und leicht biologisch abbaubar. Alle diese Faktoren erhöhen die Energie- bzw. Ressourceneffizienz und führen zu nachhaltigeren Produktionen (Rosenthal & Lütz, 2018; Woodley, 2008).

Aus den oben genannten Vorteilen, welche Enzyme mit sich bringen, ergeben sich aber gleichzeitig auch Limitierungen im Hinblick auf die Anwendung innerhalb industrieller Prozesse. Die hohe Selektivität nativer Enzyme erlaubt nur die Verwendung der natürlichen Substrate bzw. strukturell verwandter Moleküle. Dieser Umstand wiederum beschränkt auch die erreichbaren Aktivitäten bzw. Ausbeuten beim Einsatz nicht natürlicher Substrate. Zudem sind Enzyme in der Regel metastabil bzw. empfindlich gegenüber hohen Temperaturen, extremen pH-Werten, organischen Lösungsmitteln und Metallionen (Buchholz et al., 2012; Victorino da Silva Amatto et al., 2021). Hier bedarf es also der Optimierung, um sie als effiziente Biokatalysatoren für großtechnische Herstellungsprozesse einsetzen zu können. Das Enzym-Engineering ist anhand moderner Methoden in der Lage, solche Optimierungen zu leisten. Dieses Methodenspektrum soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.1 Enzym-Engineering

Die Grundlage für das moderne Enzym-Engineering wurde durch zwei wesentliche Meilensteine gelegt, welche die industrielle Anwendbarkeit von Enzymen auf eine neue Ebene brachten (Vogel & May, 2019). Dies war zum einen die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie, wofür Paul Berg im Jahre 1980 den Nobelpreis für Chemie erhielt (Berg & Mertz, 2010). Zum anderen die Arbeiten von Frances H. Arnold zur gerichteten Evolution von Enzymen, wofür sie 2018 ebenfalls den Nobelpreis für Chemie erhielt (Arnold, 2018). Basierend auf diesen

Errungenschaften und dem steigenden Bedarf an optimierten Biokatalysatoren wurden in der Folge zahlreiche Technologien für ein effizientes Enzym-Engineering entwickelt.

Zwei wesentliche Konzepte haben sich als die klassischen Strategien im Enzym-Engineering herauskristallisiert: Das rationale Enzymdesign und die gerichtete Evolution. Welcher dieser beiden Strategien für die Optimierung eines Enzyms am geeigneten ist, hängt von den jeweiligen Ausgangsbedingungen ab. Um ein rationales Enzymdesign erfolgreich durchführen zu können, sind Informationen zur Proteinstruktur, dem Katalysemechanismus sowie die Lokalisierung des aktiven Zentrums eines Enzyms unabdingbar, da hier basierend auf diesen Daten gezielt Aminosäurepositionen für eine Mutagenese ausgewählt werden, welche Einfluss auf den gewünschten Effekt haben könnten (Böttcher & Bornscheuer, 2018). Für eine Optimierung mittels gerichteter Evolution hingegen, sind diese Informationen nicht notwendig, da die Mutagenese ausschließlich zufallsbasiert erfolgt. Jedoch ist der Erfolg hier stark von einer geeigneten Mutagenesemethode abhängig. Zudem sind angesichts der häufig großen Mutantenbibliotheken, welche durch die Zufallsmutagenese generiert werden, effiziente Hochdurchsatz-Systeme für Selektion und Screening notwendig, um optimierte Varianten identifizieren zu können (Buchholz et al., 2012). Diese klassischen Konzepte werden zudem durch eine Kombination beider ergänzt, welche als semi-rationales Enzymdesign bezeichnet wird. Dieser Ansatz soll die Vorteile des rationalen Designs und der gerichteten Evolution vereinen, indem auf Basis von Strukturdaten gezielt Aminosäurepositionen ausgewählt und anschließend mittels Zufallsmutagenese randomisiert werden. So können kleinere Bibliotheken von höherer Qualität generiert werden, was wiederum den Anteil nicht funktionaler bzw. inaktiver Enzymvarianten verringert. Dadurch werden auch die Anforderungen an die für Selektion und Screening verwendeten Methoden reduziert, da ein geringerer Durchsatz ausreichend ist, um optimierte Varianten zu identifizieren (Chica et al., 2005; Lutz, 2010). Die folgenden Kapitel sollen eine Übersicht der im Bibliotheksdesign, Screening und Selektion häufig verwendeten Methoden geben.

1.2 Methodenspektrum im Bibliotheksdesign

Eine der ältesten Methoden zur randomisierten Mutagenese, welche auch im Rahmen zahlreicher Optimierungen von Enzymen eingesetzt wurde, ist die *error-prone*-PCR (Cadwell & Joyce, 1992; Leung, 1989). Anhand dieser Methode werden mittels PCR zufällige Punktmutationen in das amplifizierte Gen eingeführt. Dementsprechend sind keine Strukturdaten des betreffenden Proteins notwendig und die Methode wird der gerichteten Evolution zugeordnet (McCullum et al., 2010). Das Funktionsprinzip der *error-prone*-PCR basiert auf der natürlichen Fehlerrate der verwendeten DNA-Polymerase. Hier kommt häufig die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* zum Einsatz, da sie eine vergleichsweise hohe Fehlerrate besitzt (Keohavong & Thilly, 1989). Diese kann durch verschiedene Parameter wie erhöhte MgCl₂-Konzentrationen (Ling et al., 1991), die Zugabe von MnCl₂ (Lin-Goerke et al., 1997) oder nicht äquimolare Konzentrationen der Nukleotide gesteigert werden (Fromant et al., 1995). Dem Anwender dieser Methode sollten jedoch auch die Limitierungen bewusst sein. Aufgrund der statistischen Gleichverteilung bei der Mutagenese mittels *error-prone*-PCR kommt es mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nur zum Austausch einer Base innerhalb eines Basentriplets. Dadurch können neun verschiedene Codone entstehen, welche aufgrund der Redundanz des genetischen Codes nur für vier bis sieben verschiedene Aminosäuren codieren. Zudem treten bei bestimmten Codonen (z.B. CGA (Arginin)) mit höherer Wahrscheinlichkeit stille Mutationen auf (Eggert et al., 2004). Diese Faktoren führen letztendlich zu einer geringeren Diversität der Bibliothek auf Protein-Ebene, was bei der Auswertung der generierten Daten berücksichtigt werden sollte.

Wenn Strukturdaten zu dem betreffenden Protein vorhanden sind bzw. bestimmte Aminosäurepositionen randomisiert werden sollen, bietet sich eine (ortsspezifische) Sättigungsmutagenese an. Sollen z.B. Parameter wie die Aktivität, Spezifität oder Stereoselektivität optimiert werden, ist es häufig von Vorteil, Aminosäurepositionen auszuwählen, welche sich im aktiven Zentrum befinden bzw. mit dem Substrat interagieren (Siloto & Weselake, 2012). Im Gegensatz dazu kann es sich für die Optimierung der Stabilität positiv auswirken, wenn Positionen gewählt werden, welche vom aktiven Zentrum weiter entfernt sind (Morley & Kazlauskas, 2005). Die Randomisierung erfolgt bei der Sättigungsmutagenese ebenfalls

anhand von PCR-basierten Methoden wie QuikChange (Hogrefe et al., 2002), Megaprimer-Mutagenese (Miyazaki & Takenouchi, 2002; Sarkar & Sommer, 1990) oder *overlap-extension*-PCR (Ho et al., 1989). Dabei werden degenerierte Primer eingesetzt, welche an den zu randomisierenden Codonen z.B. ein NNN-Motiv (N: A/C/G/T) enthalten. So können alle 64 Basen-Triplets des genetischen Codes an den randomisierten Positionen auftreten, was jedoch auch einige Nachteile mit sich bringt. Zum einen erzeugt die Redundanz des genetischen Codes ein gehäuftes Auftreten bestimmter Aminosäuren (z.B. Serin mit sechs Codonen), während andere Aminosäuren unterrepräsentiert sind (z.B. Tryptophan mit einem Codon). Zum anderen können auch die drei Stoppcodone auftreten, was die Funktionalität der Bibliothek auf Protein-Ebene einschränkt (Labrou, 2009; Patrick & Firth, 2005). Nicht zuletzt erhöhen 64 mögliche Codone je Randomisierungsposition die Diversität der Bibliothek erheblich, was wiederum den Aufwand im Rahmen eines Screenings oder Selektion erhöht (Reetz et al., 2008). Durch die Verwendung alternativer Motive wie NNK oder NNS (N: A/C/G/T; K: G/T; S: G/C) werden diese Nachteile adressiert, indem die relativen Häufigkeiten der verschiedenen Aminosäuren annähernd nivelliert, die Häufigkeit von Stoppcodonen verringert und die Diversität reduziert wird (Patrick & Firth, 2005). Die Qualität der Bibliothek kann durch den Einsatz von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen für die Synthese der degenerierten Primer noch weiter gesteigert werden. Anhand dieser Methode lässt sich gezielt steuern, welche Codone an den Randomisierungspositionen enthalten sein sollen und in welchen molaren Verhältnissen sie vorliegen. So können 20 Codone für die 20 kanonischen Aminosäuren im äquimolaren Verhältnis eingesetzt werden, was die genannten Nachteile der NNN- oder NNK-Motive umgeht (Kayushin et al., 1996; Ono et al., 1995).

Mit der iterativen Sättigungsmutagenese wurde eine Strategie entwickelt, anhand derer systematisch Aminosäurepositionen randomisiert werden, um eine bestimmte Eigenschaft eines Enzyms zu optimieren. Dazu werden zunächst mithilfe von Struktur- und Literaturdaten Positionen ausgewählt, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf den gewünschten Effekt haben. Diese werden anschließend in Bereiche aus ein bis drei (oder mehr) Aminosäuren gruppiert. Erhält man z.B. vier Bereiche A, B, C und D, werden diese anhand einer

Sättigungsmutagenese einzeln randomisiert, wodurch vier unterschiedliche Bibliotheken generiert werden. Daraufhin werden die besten Enzymvarianten aus diesen Bibliotheken mittels Selektion bzw. Screening identifiziert. Die Gene dieser Varianten dienen nun als Template für eine weitere Sättigungsmutagenese unter Verwendung der jeweils anderen Bereiche (z.B. werden bei der Variante aus Bibliothek A die Bereiche B, C und D randomisiert), wobei auch hier die Randomisierung der Bereiche einzeln erfolgt, was zu insgesamt zwölf neuen Bibliotheken führt. Dieser Prozess aus iterativen Zyklen wird so lang fortgesetzt, bis das gewünschte Ziel erreicht ist (Reetz & Carballera, 2007). Die hohe Effizienz der iterativen Sättigungsmutagenese spiegelt sich in einer Vielzahl von Enzymen wieder, welche anhand dieser Methode optimiert bzw. modifiziert wurden (Reetz, 2011). Ursächlich hierfür ist zum einen der verringerte Screening-Aufwand, da durch die Gruppierung in randomisierte Bereiche die Diversität jeder generierten Bibliothek klein gehalten wird. Dadurch wird gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit erhöht, je Bereich die Mutationen mit dem größten positiven Effekt identifizieren zu können. Trotzdem werden anhand der iterativen Zyklen synergistische Effekte von Mutationen in verschiedenen Bereichen nicht ausgeschlossen (Reetz et al., 2010). Zwei Varianten der iterativen Sättigungsmutagenese sind die CAST (*combinatorial active-site saturation test*)- und die B-FIT-Methode. Erstere wird angewendet, wenn z.B. die Stereoselektivität, die Spezifität oder die Aktivität eines Enzyms verändert werden soll, während die B-FIT-Methode zum Einsatz kommt, wenn die Stabilität gegenüber Faktoren wie Temperatur oder organischen Lösungsmitteln optimiert werden soll (Parra et al., 2013). Der wesentliche Unterschied zwischen diesen Methoden liegt in der Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurepositionen. Bei der CAST-Methode werden ausschließlich Positionen ausgewählt, deren Aminosäureseitenketten in oder nahe der Substratbindetasche liegen (Reetz, Wang, et al., 2006). Im Gegensatz dazu werden bei der B-FIT-Methode Positionen mit einem hohen B-Faktor identifiziert und randomisiert (Reetz, Carballera, et al., 2006; Sun et al., 2019). Dieser B-Faktor wird mittels hochauflösender Röntgenkristallografie bestimmt und repräsentiert die Streuung der atomaren Elektronendichte aufgrund von thermischer Bewegung, wodurch dieser Wert mit der Flexibilität von Aminosäuren korreliert (Parthasarathy & Murthy, 2000).

Die Auswahl der Randomisierungspositionen im Bibliotheksdesign stellt insbesondere bei der Sättigungsmutagenese einen kritischen Erfolgsfaktor dar. Um den Anwender bei dieser Auswahl zu unterstützen und die Erfolgschancen eines Enzym-Engineerings zu erhöhen, wurde eine Vielzahl computergestützter Methoden entwickelt. In Tabelle 1 sind prominente Vertreter dieser Methoden aufgelistet.

Tabelle 1: Auswahl computergestützter Methoden im Enzym-Engineering

Name (Quelle)	Input	Output	Datenbanken/Algorithmen
HotSpot Wizard (Pavelka et al., 2009; Sumbalova et al., 2018)	PDB-ID bzw. -Datei, Sequenz	Hotspots für Engineering hinsichtlich Spezifität, Aktivität, Enantioselektivität und Stabilität	PDB, UniProt, PDBSWS, Catalytic Site Atlas, NCBI
CASTp (Dundas et al., 2006)	PDB-ID	Bindetaschen und Leerräume in Proteinen sowie funktionelle Aminosäuren mit biologischer Relevanz	PDB, Swiss-Prot, OMIM
3DM (Kuijpers et al., 2010)	UniProt-ID (o.ä.)	Hotspots für Engineering hinsichtlich Spezifität, Aktivität und Stabilität	PDB, Swiss-Prot, GenBank, PubMed, Mutations-Datenbanken
ConSurf (Ashkenazy et al., 2010)	PDB-ID bzw. -Datei, Sequenz	konservierte Aminosäurepositionen in Proteinen	Swiss-Prot, UniProt, NCBI
IPRO (Pantazes et al., 2015)	CHARMM/ PDB-Datei	Mutationen zur Veränderung der Affinität, Spezifität oder Aktivität von Proteinen bzw. Enzymen für beliebige Liganden	Algorithmen zur Lösung gemischtganzzahliger Programme und Energieminimierung
CUPSAT (Parthiban et al., 2006)	PDB-ID bzw. -Datei	Änderung der Proteinstabilität durch Punktmutationen	Nutzt Atom- und Torsionswinkelpotentiale
CAVER (Chovancova et al., 2012)	PDB-ID bzw. -Datei	Tunnel und Kanäle in Proteinstrukturen sowie die assozierten Aminosäurepositionen	Algorithmen basierend auf Voronoi-Diagrammen
FoldX (Buß et al., 2018; Guerois et al., 2002)	PDB-Datei	Änderung der Proteinstabilität durch Punktmutationen	Empirischer Kraftfeldalgorithmus basierend auf ΔG -Werten

Welche dieser computergestützten Methoden sich für die jeweilige Enzym-Optimierung eignet, ist abhängig davon, welcher Parameter (z.B. Aktivität, Enantioselektivität oder Stabilität) verbessert werden soll und welche Faktoren den jeweiligen Parameter beeinflussen. Diese Faktoren sind wiederum durch die spezifischen Eigenschaften eines Enzyms, wie z.B. der Proteinstruktur oder dem katalysierten Reaktionsmechanismus, vorbestimmt. Soll exemplarisch die Spezifität eines Enzyms verändert werden und in der Proteinstruktur liegt ein Tunnel vor, durch welchen das Substrat in das aktive Zentrum gelangt, bietet sich CAVER (siehe Tabelle 1) als computergestützte Methode an. So können Informationen generiert werden, wie die Zugänglichkeit für verschiedene Substrate durch Mutagenesen reguliert werden kann. Dahingegen bieten sich Methoden wie HotSpot Wizard oder IPRO an, um Aminosäurepositionen im Bindungstaschen-Bereich zu identifizieren, deren Mutagenese die Affinität für ein Substrat modulieren kann. Durch den stetig steigenden Bedarf für neue Biokatalysatoren und dem Bestreben Prozesse im Enzym-Engineering möglichst schnell, kosteneffizient und erfolgreich zu gestalten, wird auch die ständige Entwicklung neuer computergestützter Methoden vorangetrieben, was sich in einer Fülle neuer Veröffentlichungen in den letzten Jahren widerspiegelt (Marques et al., 2021).

Die praktische Anwendung solcher Methoden aus der Bioinformatik kann am Beispiel der c-LECTa GmbH (Leipzig) veranschaulicht werden. Dieses Biotechnologie-Unternehmen hat eine Reihe bioinformatischer Werkzeuge entwickelt, welche als multidimensionale Mutagenese (MDM)-Plattform bezeichnet werden. Diese MDM-Plattform liefert eine Routine für das Bibliotheksdesign, indem sie Struktur-, Molekulardynamik-, Funktions- und Homologie-Informationen nutzt und sich zudem mit rationalen Ansätzen ergänzen lässt. Die erfolgreiche Anwendung dieser Technologie wurde z.B. bereits anhand der Optimierung des Enzyms Cellobiose-Phosphorylase zur Synthese von Cellobiose eindrucksvoll demonstriert (Brucher & Hässler, 2019).

1.3 Selektion und Screening

Neben dem Bibliotheksdesign stellt auch die Verfügbarkeit geeigneter Systeme für Selektion und Screening eine wichtige Komponente im Enzym-Engineering dar.

Die diesen beiden Oberbegriffen zugeordneten Methoden sollen es ermöglichen, optimierte Varianten aus einer randomisierten Enzym-Bibliothek zu identifizieren. Der Unterschied zwischen Selektion und Screening besteht darin, dass bei der Selektion definierte Bedingungen angewendet werden, um aus dem Varianten-Pool der gesamten Bibliothek diejenigen herauszufiltern bzw. zu selektieren, welche die gewünschte Eigenschaft zeigen. Dahingegen werden im Rahmen eines Screenings individuelle Varianten der Bibliothek auf einen bestimmten Parameter hin analysiert, was dementsprechend eine gewisse räumliche Trennung (z.B. durch Agarplatten, Mikrotiterplatten oder Chips) der Einzelvarianten erfordert (Aharoni et al., 2005). Eine Gemeinsamkeit aller Methoden, welche der Selektion oder dem Screening zugeordnet werden, ist die Erfordernis einer Verknüpfung der genetischen Information mit der enzymatischen Aktivität, was auch als Genotyp-Phänotyp-Kopplung bezeichnet wird. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass DNA deutlich einfacher sequenziert werden kann als das Protein selbst, wodurch anhand von DNA die Aminosäuresequenz und damit auch die eingeführten Mutationen einer optimierten Enzymvariante wesentlich einfacher analysiert werden können. Die Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp kann dabei sowohl durch eine physische Verbindung z.B. in Form von Zellkompartimenten hergestellt werden oder auch anhand einer räumlichen Adresse bzw. Zuordnung, wie es bei Mikrotiterplatten-Screenings häufig der Fall ist (Lin & Cornish, 2002; Markel et al., 2020).

Der entscheidende Vorteil etablierter Selektions-Methoden gegenüber einem Screening ist die hohe Anzahl an Varianten, welche gleichzeitig analysiert werden können (Taylor et al., 2001). Die in Kapitel 1.2 beschriebenen Methoden im Bibliotheksdesign ermöglichen die Generierung von Bibliotheken mit mehr als 10^{12} verschiedenen Varianten (Kille et al., 2013). Klassische Screening-Methoden erreichen jedoch nur einen Durchsatz von bis zu 10^5 Varianten pro Tag, während unter Verwendung von modernen Ultra-Hochdurchsatz-Methoden beachtliche 10^9 Varianten pro Tag gescreent werden können (Bunzel et al., 2018; Markel et al., 2020). Anhand einer Selektion können dahingegen 10^{10} - 10^{15} Varianten zeitgleich in einem Durchlauf untersucht werden, was den Prozess dementsprechend erheblich beschleunigt (M. Baker, 2011; Boersma et al., 2007).

Eine häufig verwendete Selektionsmethode ist die genetische Selektion, was auf den geringen apparativen Aufwand und die relativ einfache Durchführung zurückzuführen ist. Die Funktionsweise der genetischen Selektion basiert auf der Verknüpfung einer Enzymaktivität mit dem Überleben einer Zelle. Hierzu wird die metabolische Voraussetzung für die gewünschte Aktivität in die Wirtszellen (z.B. *E. coli*) eingeführt, indem z.B. anhand von Gendeletionen defiziente Zellstämme generiert werden, welche ohne die Zugabe bestimmter Nährstoffe oder die Wiedereinführung der notwendigen Enzymaktivität nicht überleben können. Diese Zellstämme können daraufhin für die Transformation mit einer randomisierten Enzyrbibliothek eingesetzt werden, wodurch Varianten selektiert werden, welche die gewünschte Aktivität besitzen und so das Überleben des Wirtsorganismus ermöglichen (Woycechowsky & Hilvert, 2004). Diese Methode wurde unter anderem erfolgreich angewendet, um die dimere Chorismat-Mutase in eine monomere Form zu transformieren, während die native Aktivität erhalten blieb (MacBeath et al., 1998). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Chorismat in Prephenat anhand einer Claisen-Umlagerung, was einen Reaktionsschritt im Shikimatweg darstellt. Somit ist die Chorismat-Mutase für die Biosynthese der essentiellen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin in Pflanzen, Bakterien und Pilzen notwendig, wodurch die genetische Selektion hier prädestiniert ist. Dieses Beispiel veranschaulicht auch die Limitierungen dieser Methode. So eignet sich die genetische Selektion nur zur Anwendung auf Enzymaktivitäten, welche unter den vorherrschenden Bedingungen in der Wirtszelle stattfinden und von denen das Überleben der Zelle abhängig gemacht werden kann (Taylor et al., 2001). Mit dem Ziel diese Limitierungen zu adressieren, wurde eine ergänzende Methode zur genetischen Selektion entwickelt, welche chemische Komplementierung getauft wurde (K. Baker et al., 2002). Hier wird die enzymatische Aktivität an die Transkription eines Reportergens gekoppelt, wodurch das Überleben der Zelle nur indirekt von dem zu optimierenden Enzym abhängig ist. Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Optimierung von Enzymen wie der Glycosynthase (Lin et al., 2004) und der Cellulase (Peralta-Yahya et al., 2008) eingesetzt.

Die Verwendung molekularer Display-Technologien zur Entwicklung neuer bzw. Optimierung bestehender proteinbasierter Bindemoleküle wie Antikörpern ist

naheliegend und in der Literatur zahlreich beschrieben (Hayhurst & Georgiou, 2001; Kontermann & Dübel, 2010). Jedoch finden dazu zählende Methoden wie Phagen-, Ribosomen-, mRNA-, Bakterien- oder Hefe-Display auch Anwendung im Enzym-Engineering (Amstutz et al., 2001; Forrer et al., 1999). Der große Vorteil dieser Methoden besteht darin, dass besonders viele Varianten von bis zu 10^{15} gleichzeitig selektiert werden können (M. Baker, 2011). Auf das Phagen-Display als Selektionsmethode für die Optimierung von Enzymen wird in Kapitel 1.4 detailliert eingegangen. Das Ribosomen- und mRNA-Display basieren auf der Verknüpfung der funktionalen Proteinvarianten mit der für das Protein codierenden mRNA, wodurch die Genotyp-Phänotyp-Kopplung erreicht wird. Beim Ribosomen-Display wird diese Kopplung anhand eines nicht kovalenten ternären Komplexes aus Ribosom, mRNA und dem entstehenden Polypeptid generiert. Durch ein fehlendes Stoppcodon, hohen Konzentrationen an Magnesium-Ionen und geringen Temperaturen wird dieser Komplex stabilisiert (Hanes & Plückthun, 1997). Dahingegen basiert das mRNA-Display auf einer kovalenten Kopplung der mRNA mit dem codierten Protein. Hier wird die mRNA am 3'-Ende mit einem DNA-Linker funktionalisiert, welcher wiederum mit Puromycin modifiziert ist. Erreicht das Ribosom die RNA-DNA-Verbindung, wird die *in-vitro*-Translation zum Stillstand gebracht. Nun wird das Puromycin über die Peptidyltransferase-Funktion des Ribosom an das translatierte Protein geknüpft, wodurch auch die mRNA kovalent gebunden ist (Roberts & Szostak, 1997). Die grundsätzliche Anwendbarkeit des Ribosomen- und mRNA-Displays im Zuge eines Enzym-Engineerings wurde exemplarisch anhand einer β -Lactamase (Amstutz et al., 2002) und der *de-novo*-Generierung einer RNA-Ligase (Seelig & Szostak, 2007) gezeigt. Dennoch werden diese Methoden selten in Verbindung mit Biokatalysatoren angewendet (Boersma et al., 2007). Bei den Zell-basierten Display-Systemen wie dem Bakterien- und Hefe-Display wird die Genotyp-Phänotyp-Kopplung dadurch garantiert, dass nur Protein-Varianten, deren Gene in der jeweiligen Zelle vorhanden sind, auch auf der Zelloberfläche präsentiert werden können. Die Präsentation wird anhand von Fusionsproteinen aus den Protein-Varianten mit einem membranständigen Oberflächenprotein realisiert (M. R. Smith et al., 2015). Als Organismen werden häufig *E. coli*, *S. cerevisiae* oder *P. pastoris* verwendet. Im Falle von *E. coli* werden häufig die

outer-membrane-Proteine (OmpA, OmpC, OmpT), Autotransporter-Proteine und Eisnukleations-Proteine als Träger oder Transporter für die Präsentation auf der Zelloberfläche genutzt (van Bloois et al., 2011), während bei Hefen oft α - und α -Agglutinin Anwendung finden (Tanaka et al., 2012). Anhand des Bakterien-Displays wurde beispielsweise die Enantioselektivität der *Pseudomonas aeruginosa* Esterase EstA im Zuge einer gerichteten Evolution erfolgreich verbessert (Becker et al., 2008). Während das Wildtyp-Enzym nur eine geringe Selektivität zeigte, welche leicht auf der Seite des (*S*)-Enantiomers lag ($E_{app} = 1,2$), konnte unter Verwendung des Bakterien-Displays in Kombination mit einer FACS die Variante 2-R-43 selektiert werden, welche eine hohe Selektivität für das (*R*)-Enantiomer ($E_{app} = 16,3$) aufwies. Als Beispiel für eine erfolgreiche Anwendung des Hefe-Displays im Zuge eines Enzym-Engineerings sei hier die Optimierung der Transpeptidase Sortase A aus *Staphylococcus aureus* genannt (Chen et al., 2011). Hier erfolgte die Präsentation der Varianten von Sortase A als Fusionsprotein über die Untereinheit von α -Agglutinin Aga2p, während über die Untereinheit Aga1p das Peptidsubstrat für Sortase A mit der Erkennungssequenz LPETG präsentiert wurde. Durch die Zufügung des zweiten Peptidsubstrates mit *N*-terminalem GGG-Motiv, welches zuvor mit Biotin funktionalisiert wurde, katalysieren aktive Varianten der Sortase A die pseudointramolekulare, kovalente Verknüpfung der beiden Substrate. Die so immobilisierten Biotin-Moleküle wurden über fluoreszenzmarkiertes Streptavidin nachgewiesen und fluoreszierende Hefe-Zellen mittels FACS isoliert. Anhand dieser Strategie konnte eine Variante der Sortase A generiert werden, deren k_{cat}/K_M -Wert um den Faktor 140 im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist.

Anhand der aufgeführten Beispiele an Selektionsmethoden, welche erfolgreich für die Optimierung von Biokatalysatoren eingesetzt wurden, kann deren großes Potential belegt werden. Insbesondere im Kontext des Enzym-Engineerings gehen diese Methoden jedoch auch mit einigen Limitation einher. Je nach Enzym, der katalysierten Reaktion bzw. dem Ziel der Optimierung lassen sich einzelne Selektionsmethoden nicht oder nur nach umfangreichen Anpassungen anwenden (Delagrange & Murphy, 2003; Firestone et al., 2000). Soll die Selektion unter unnatürlichen Reaktionsbedingungen (z.B. hohe Temperaturen, organische Lösungsmittel) durchgeführt werden, sind insbesondere die Methoden *in vivo* aber unter

Umständen auch *in vitro* nicht geeignet (Arnold & Moore, 1997; You & Arnold, 1996). In solchen Fällen sollte statt einer Selektion ein geeignetes Screening-System angewendet werden. Zwar liefern die Screening-Systeme in der Regel nicht die hohen Durchsätze, welche mit den Methoden der Selektion erzielt werden können (s.o.), jedoch hat ein Screening den Vorteil, dass die Produktbildung und damit die katalytische Aktivität zumeist (zeitaufgelöst) quantifiziert werden kann (Olsen et al., 2000), was auch auf die häufige Verwendung von fluorogenen oder chromogenen Substraten zurückzuführen ist (Sheludko & Fessner, 2020; Wahler & Reymond, 2001). Dieser Umstand legitimiert auch den ergänzenden Einsatz eines Screenings zu einer vorhergehenden Selektion. Anhand dieser Strategie können optimierte Varianten zunächst mittels Selektion angereichert und im nachfolgenden Schritt die besten Kandidaten mittels Screening identifiziert werden.

Jedes etablierte Screening-System setzt sich aus den drei folgenden, wesentlichen Elementen zusammen (Longwell et al., 2017):

- 1) Kompartimentierung von Einzelvarianten und Reaktionsbestandteilen,
- 2) optische Analysemethode zur Detektion der katalytischen Aktivität,
- 3) Strategie zur Rückgewinnung der genetischen Information.

Die am häufigsten verwendeten Screening-Methoden basieren auf dem Einsatz von Mikrotiterplatten (MTP), was auf den vergleichsweise geringen apparativen Aufwand und die hohe Flexibilität zurückzuführen ist (Leemhuis et al., 2009; Martínez & Schwaneberg, 2013). Die Kompartimentierung der Einzelvarianten wird anhand der separierten Kavitäten sichergestellt, in denen die isolierten Enzymvarianten oder Zellklone mit der genetischen Information vorliegen. So wird auch die Rückgewinnung der Gensequenzen optimierter Varianten ermöglicht, indem die räumlichen Adressen einzelner Kavitäten einer Screening-MTP den Kavitäten einer Glycerolstock- oder Master-MTP eindeutig zuzuordnen sind. Zur Detektion des enzymatischen Umsatzes werden auch hier häufig Fluoreszenz- oder Absorptionsspektroskopie eingesetzt, wenngleich das MTP-basierte Screening auch den Einsatz von Analysemethoden wie NMR oder Massenspektrometrie zugänglich macht (van Rossum et al., 2013). Der hohen Flexibilität entsprechend wurden zahlreiche Enzyme hinsichtlich Eigenschaften wie Stabilität, Spezifität oder Aktivität anhand eines MTP-basierten Screenings optimiert. Beispiele hierfür

sind Cytochrom P450 BM3 (Bloom et al., 2006), Cyclodextrin-Glycosyltransferase (Kelly et al., 2008), Histon-Acyltransferase (Leemhuis et al., 2008), Aminotransferase (Genz et al., 2015) oder Esterasen (Lülsdorf et al., 2015).

Eine weitere Möglichkeit der Kompartimentierung ist die Verwendung mikrobieller Zellen. Bakterien wie *E. coli* oder Hefe-Zellen dienen hier als natürliche Reaktionsgefäß (Sadler et al., 2018; Vanella et al., 2022). Die Vorteile liegen zum einen in der intrinsischen Phänotyp-Genotyp-Kopplung, was die Rückgewinnung der genetischen Information einfach gestaltet. Zum anderen ermöglicht die Anwendung der Durchfluszytometrie bzw. FACS sehr hohe Durchsätze von 10^6 - 10^8 Zellen bzw. Varianten pro Stunde (Becker et al., 2004; Mair et al., 2017). Die Herausforderung liegt hier darin, dass das Substrat die Zellmembran passieren kann oder schon in der Zelle vorliegt, während das Produkt der enzymatischen Reaktion ein messbares (Fluoreszenz-) Signal liefern muss und nicht aus der Zelle heraus diffundiert. Werden Biomoleküle wie DNA oder Proteine als Substrate verwendet, ist diese Herausforderung einfach adressiert, da sie in natürlicher Weise in der Zelle vorkommen. So wurde bereits die Cre-Rekombinase (Santoro & Schultz, 2002) oder das Chaperon GroEL (J. D. Wang et al., 2002) in einem Zell-basierten Screening optimiert, indem die enzymatische Aktivität an die rekombinante Expression oder Faltung eines fluoreszierenden Proteins gekoppelt wurde. Aber auch niedermolekulare Substrate können hier Anwendung finden, wie es anhand eines Engineerings der Sialyl-Transferase CstII demonstriert wurde (Aharoni et al., 2006). Hier wurde Fluoreszenz-markierte Lactose oder Galactose als Substrat verwendet, welche durch spezifische Transporter die Zellmembran von *E. coli* frei passieren können. Nach der mittels CstII katalysierten Sialylierung der markierten Zucker ändert sich jedoch deren Größe und Ladungszustand, wodurch sie die Zelle nicht mehr verlassen können und das Fluoreszenz-Signal akkumuliert wird.

Die genannten Einschränkungen der Zellen-basierten Kompartimentierung limitieren entsprechend deren Einsatz auf das Engineering von Enzymen, für welche geeignete Substrate zur Verfügung stehen. Durch die Verwendung einer künstlich generierten *in-vitro*-Kompartimentierung (IVC) in Form von Emulsionen bzw. Wasser-in-Öl-Tröpfchen kann diese Limitation umgangen werden (Longwell et al., 2017). Die Vielseitigkeit der damit assoziierten Technologien und die daraus

resultierenden Möglichkeiten sind beachtlich. So können solche Tröpfchen aufgeteilt, fusioniert, sortiert, inkubiert und verdünnt werden (Dressler et al., 2017). Zudem können definierte Volumina in die Tröpfchen injiziert werden. Dabei können sie in einem breiten Temperatur-, pH-Wert- und Salzkonzentrationsbereich eingesetzt werden und sind auch gegenüber Gefrier-Tau-Zyklen stabil (Griffiths & Tawfik, 2006; Zinchenko et al., 2014). Die ursprüngliche Herstellung der Emulsionen erfolgte beispielsweise mittels Rühren (Tawfik & Griffiths, 1998) oder Extrusion (Mastrobattista et al., 2005), wobei in der Regel stark polydisperse Emulsionen entstehen, was die zuverlässige Detektion aktiver Enzyme wiederum erschweren kann (Bunzel et al., 2018). Das führte zur Entwicklung verschiedener Mikrofluidik-Geräte, welche in einem Hochdurchsatz-Screening anwendbar sind und anhand derer monodisperse Emulsionen generiert werden können (Agresti et al., 2010; Lim & Abate, 2013; Mazutis et al., 2013). Auch die Biosynthese der Enzymvarianten in den Tröpfchen ist variabel und kann mittels *in-vitro*-Transkription-Translation (Fallah-Araghi et al., 2012) oder Zellen-basiert (Hardiman et al., 2010) durchgeführt werden. Angesichts der Vielseitigkeit der IVC wurde diese Technologie für das Screening diverser Biokatalysatoren eingesetzt. Die DNA-Methyltransferase HaeIII war ein erstes Anwendungsbeispiel (Tawfik & Griffiths, 1998). Weitere Anwendungen waren die Veränderung der Substratspezifität der *Taq*-Polymerase (Ghadessy et al., 2004) oder die Erhöhung der Aktivität einer bakteriellen Phosphotriesterase (Griffiths & Tawfik, 2003). Als aktuelleres Beispiel sei hier die Optimierung der Protease Savinase hinsichtlich einer erhöhten Aktivität erwähnt (Holstein et al., 2021).

1.4 Phagen-Display zur Selektion enzymatischer Aktivität

Obwohl das Phagen-Display als Selektionsmethode mittlerweile fast 40 Jahre alt ist (G. P. Smith, 1985), hat es nicht an Relevanz verloren, im Gegenteil. So stellt es auch heute noch eine effektive Methode für die Entwicklung therapeutischer oder diagnostischer Antikörper dar (Kumar et al., 2019; Nagano & Tsutsumi, 2021). Aber auch andere Anwendungen wie die Entwicklung therapeutischer Peptide (Mimmi et al., 2019; Saw & Song, 2019) oder neuartiger Impfstoffe (Hess & Jewell, 2020) rücken immer mehr in den Fokus. Im Zuge der globalen COVID-19

Pandemie und der damit assoziierten Suche nach neuen Therapeutika hat das Phagen-Display noch weiter an Bedeutung gewonnen (Anand et al., 2021). Die Funktionsweise des Phagen-Displays basiert, wie auch bei anderen Display-Technologien (siehe 1.3), auf der Kopplung von Phänotyp und Genotyp. Hierzu wird das Gen bzw. die Genbibliothek eines Peptides oder Proteins in einen Phagemid subkloniert, so dass diese nach Expression als N-terminale Fusion mit Hüllproteinen eines Bakteriophagen vorliegen und auf der Oberfläche präsentiert werden. Das Gen des jeweils präsentierten Fusionsproteins liegt dabei als einzelsträngige DNA in dem Phagen vor. Häufig wird dabei das Hüllprotein p3 des filamentösen Bakteriophagen M13 für die Präsentation genutzt (Kehoe & Kay, 2005; Ledsgaard et al., 2018). Das weitere Verfahren gleicht einer Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie und wird *biopanning* genannt. Das Zielmolekül oder Antigen (häufig Rezeptoren oder deren extrazelluläre Domänen) wird auf einem Trägermaterial immobilisiert und die Variantenbibliothek-präsentierenden Phagen hinzugegeben. Peptide/Proteine mit einer Affinität für das Zielmolekül werden gebunden und ungebundene Phagen durch Waschen entfernt. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgt daraufhin kompetitiv mit freiem Antigen bzw. Liganden, mittels Veränderung des pH-Werts, Veränderung der Ionenstärke oder Ultraschall. Die eluierten Phagen können daraufhin vermehrt werden, indem sie zur Infektion von Wirtszellen wie *E. coli* eingesetzt werden. Das ermöglicht den Einsatz der angereicherten Varianten bzw. Phagen für weitere Selektionsrunden oder auch die Charakterisierung von Einzelvarianten. Häufig werden auf diese Art und Weise mehrere Selektionsrunden durchgeführt und dabei der Selektionsdruck durch abnehmende Zielmolekül-Konzentration oder extensiveres Waschen von Runde zu Runde erhöht (Hoogenboom et al., 1998; Pande et al., 2010; G. P. Smith & Petrenko, 1997).

Während die Selektion hinsichtlich Bindungseigenschaften mittels Phagen-Display also relativ einfach und universell anwendbar ist, ist die Selektion nach einer katalytischen Aktivität verhältnismäßig anspruchsvoller. Schließlich muss die Fähigkeit eines Enzym-Phagen-Komplexes eine bestimmte Reaktion zu katalysieren, mit der Fähigkeit spezifisch an eine Affinitätsmatrix binden zu können, gekoppelt werden (Soumillion & Fastrez, 2003). Hierzu wurden eine Reihe von Strategien

entwickelt, welche entsprechend ihrer Funktionsweise in direkte und indirekte Selektionen unterteilt werden (Forrer et al., 1999). Eine Selektion hinsichtlich der Bindung eines Enzyms an ein Übergangszustand-Analogon wird z.B. als indirekt bezeichnet, da hier eben nur hinsichtlich der Bindungsaffinität und nicht der realen katalytischen Aktivität selektiert wird (Abbildung 1A). Da die Katalysefähigkeit eines Enzyms jedoch auf der Bindung und Stabilisierung des Übergangszustands beruht, sollte eine solche Selektion trotzdem zielführend sein. So wurde diese Strategie erfolgreich zur Selektion von Varianten der humanen Glutathiontransferase A1-1 mit veränderter Spezifität eingesetzt (Widersten & Mannervik, 1995). Auch die Verbesserung hinsichtlich der Esterase-Aktivität eines katalytischen Antikörpers, welcher zuvor durch Immunisierung mit einem Übergangszustand-Analogon generiert wurde, konnte anhand dieser Strategie demonstriert werden (Takahashi et al., 2001).

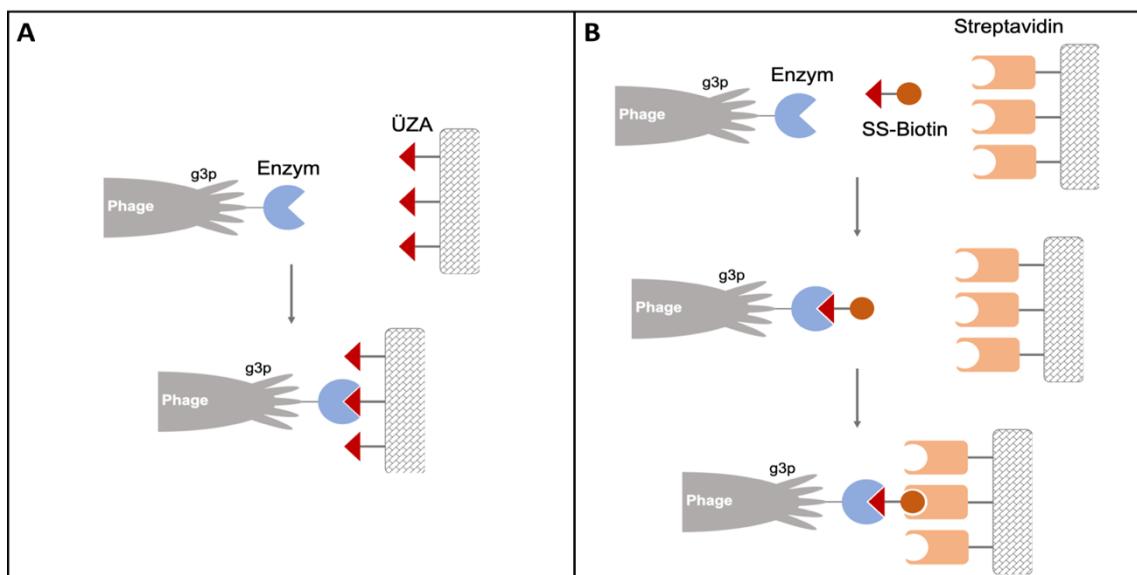


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Strategien zur indirekten Selektion auf katalytische Aktivität mittels Phagen-Display. A) Ein für das Enzym geeignetes Übergangszustand-Analogon (ÜZA) wird auf einer Matrix immobilisiert. Enzym-präsentierende Phagen werden durch Bindung an dieses ÜZA selektiert. B) Aktive Enzymspezies reagieren mit einem Suizid-Substrat, welches zuvor mit Biotin funktionalisiert wurde, entsprechend ihrem Katalysemechanismus. Mittels immobilisierten Streptavidins werden biotinylierte Phagen selektiert. Abbildung nach Forrer et al., 1999 und Fernandez-Gacio et al., 2003.

Eine weitere Form der indirekten Selektion stellt die Verwendung von biotinylierten Suizid-Substraten bzw. Mechanismus-basierter Inhibitoren dar (Abbildung 1B). Die Funktionsweise beruht auf dem Einsatz limitierender Konzentrationen dieser Suizid-Substrate. Die aktivsten Enzymvarianten reagieren am schnellsten

und sind so kovalent an den Inhibitor und das Biotin gebunden. Diese biotinylierten Enzym-Phagen-Komplexe werden anschließend mittels Streptavidin-be schichteter Matrix isoliert (Fernandez-Gacio et al., 2003). Die grundsätzliche Anwendbarkeit dieser Strategie wurde anhand des Enzyms β -Lactamase demonstriert (Soumillion et al., 1994; Vanwetswinkel et al., 1996). Zudem wurde sie erfolgreich zur Selektion katalytischer Antikörper mit β -Lactamase-Aktivität (Shahsavarian et al., 2017) und Savinase mit veränderter Spezifität (Legendre et al., 2000) verwendet. Ein limitierender Faktor dieser indirekten Selektionen ist natürlich die Verfügbarkeit entsprechender Übergangszustand-Analoga und Suizid-Substrate für das jeweilige Enzym. Da bei diesen indirekten Verfahren zudem nicht hinsichtlich einer katalysierten Produktbildung selektiert wird, kann das Ergebnis unzureichend oder ein erhöhter, anschließender Screening-Aufwand notwendig sein (Forrer et al., 1999).

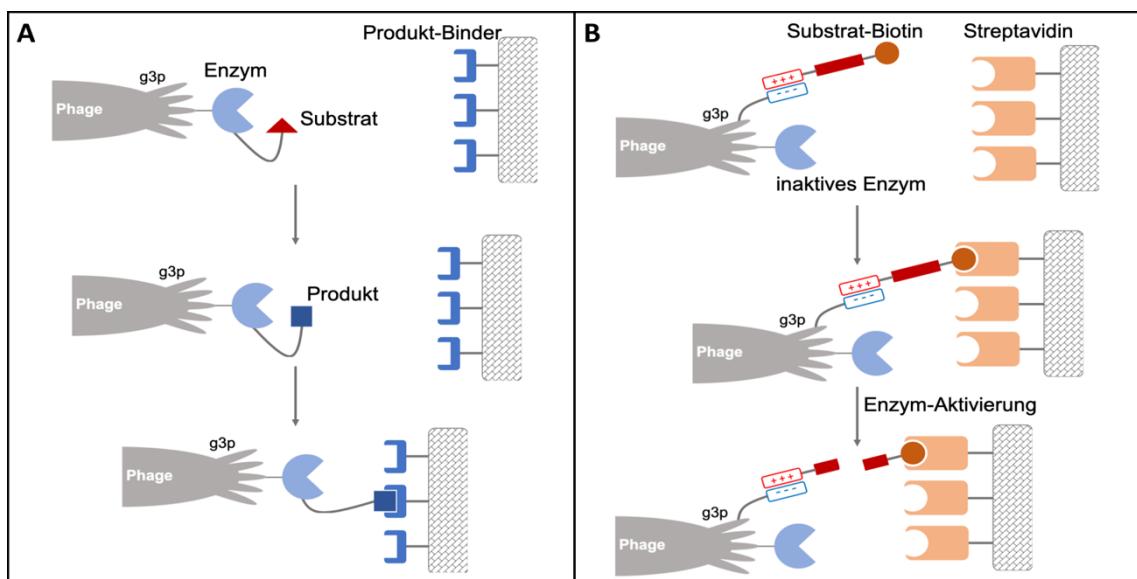


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Strategien zur direkten Selektion auf katalytische Aktivität mittels Phagen-Display. A) Neben dem Enzym wird auch das entsprechende Substrat auf der Oberfläche des Phagen präsentiert. Durch intramolekulare Katalyse wird das Produkt gebildet, welches mittels immobilisierter, spezifischer Binder selektiert wird. B) Während das inaktive Enzym über das Hüllprotein p3 präsentiert wird, wird auch eine basische Peptidsequenz auf einem anderen p3-Protein präsentiert. Darüber wird eine saure Peptidsequenz, welche mit einem Substrat (z.B. eine DNA-Sequenz) und Biotin funktionalisiert wurde, gekoppelt. Das gesamte Konstrukt wird über eine Streptavidin-beschichtete Matrix immobilisiert und das Enzym aktiviert (z.B. mittels Kofaktor-Zugabe). Dadurch werden das Substrat spaltende Enzym-Phagen-Komplexe eluiert. Abbildung nach Forrer et al., 1999 und Fernandez-Gacio et al., 2003.

Um die genannten Probleme der indirekten Strategien zu adressieren, wurden Verfahren entwickelt, welche auf der Selektion hinsichtlich Produktbildung bzw. Substratumsatz basieren. Beispiele dieser direkten Strategien sind in Abbildung 2

dargestellt. Die grundsätzliche Funktionsweise dieser direkten Selektionsverfahren beruht dabei entweder auf einer intramolekularen Produktbildung und Bindung des Produkt-Enzym-Phagen-Komplexes an eine für das Produkt spezifische Affinitätsmatrix (Abbildung 2A) oder das Freisetzen bzw. die Elution des immobilisierten Komplexes von einem festen Träger durch einen intramolekularen Substratumsatz (Abbildung 2B). Das Enzym Subtiligase (Doppelmutante von Subtilisin BPN' (Braisted et al., 1997)) beispielsweise wurde mittels Phagen-Display hinsichtlich einer erhöhten Ligase-Aktivität optimiert, indem das auf der Phagen-Oberfläche präsentierte Enzym am N-Terminus um eine Substrat-Sequenz verlängert wurde. Eine durch die Subtiligase selbst katalysierte, intramolekulare Peptidligation der N-terminalen Sequenz mit einem biotinylierten Peptid, ermöglichte so die selektive Affinitätsreinigung aktiver Enzym-Phagen-Komplexe mittels Neuravidin (Atwell & Wells, 1999). Eine sehr ähnliche Vorgehensweise wurde auch auf das Engineering der Transpeptidase Sortase A zur Veränderung der Substratspezifität angewendet (Piotukh et al., 2011; Schmohl et al., 2017). Die Eignung der direkten Selektion mittels Elution von einer Matrix nach Substratumsatz (Abbildung 2B) wurde anhand einer Staphylokokken-Ribonuklease (SNase) als Modellenzym demonstriert. Dabei wurde neben der Ca^{2+} -Ionen-abhängigen SNase auch eine saure Peptidsequenz über das Hüllprotein p3 präsentiert. Unter Ausschluss von Ca^{2+} -Ionen wurde eine basische Peptidsequenz zu den präparierten Phagen gegeben, welche mit einem einzelsträngigen Oligonukleotid als Substrat für die SNase und Biotin funktionalisiert war. Durch Interaktion der beiden Peptidsequenzen kam es zur Bildung einer Disulfidbrücke und damit der kovalenten Verknüpfung. Der gesamte Komplex wurde nun an einer Streptavidin-beschichteten Matrix immobilisiert. Die Zugabe von Ca^{2+} -Ionen führte nun zur Aktivierung der SNase, welche in einer intramolekularen Reaktion das Oligonukleotid hydrolysierte, was zur Elution der entsprechenden Phagen-Komplexe führte. So konnte ein Anreicherungsfaktor aktiver SNase von ca. 100 pro Selektionsrunde erreicht werden (Pedersen et al., 1998).

Eine neue Strategie zur direkten Selektion mittels Phagen-Display konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Bordusa (MLU Halle-Wittenberg) zur Optimierung der Trypsilgase entwickelt und etabliert werden. Die Trypsilgase basiert auf

der Serinprotease Trypsin und wurde zur ortsspezifischen Modifikation von Proteinen am N- und C-Terminus entwickelt (Details siehe 1.2). Die synthetische Effizienz der Trypsilicase ist dabei abhängig von dem Verhältnis der Aminolyseaktivität zur nativen Hydrolyseaktivität, welches mittels Enzym-Engineering zu Gunsten der Aminolyseaktivität und damit der Bildung des Aminolyseproduktes verschoben werden sollte. Erste Arbeiten im Zuge dieses Enzym-Engineerings und zur Etablierung des Phagen-Displays als Selektionsmethode wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Frau Dr. Sabrina Gissel (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Gissel, 2017)) durchgeführt. So wurde hier gezeigt, dass aktive Trypsilicase auf der Oberfläche des Bakteriophagen M13 als Fusion mit dem Hüllprotein p3 präsentiert werden kann. Zudem wurde die in Abbildung 3 gezeigte, grundlegende Strategie der direkten Selektion mittels Phagen-Display konzipiert. Diese sieht vor, dass zunächst ein Bibliotheksvarianten-präsentierender Phagenpool zu immobilisiertem Substrat mit der Erkennungssequenz YRH gegeben wird. Aktive Varianten bilden unter Abspaltung des RH-Motives ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat. Nicht kovalent gebundene Varianten und jene, welche aufgrund einer hohen Hydrolyseaktivität ein instabiles Acyl-Enzym-Intermediat bilden, werden durch Waschen entfernt. Die Elution der kovalent gebundenen Enzym-Phagen-Komplexe erfolgt daraufhin durch Zugabe eines peptidischen Nukleophils mit RH-Motiv, wodurch nur diese Enzyme eluiert werden, welche diesen finalen Reaktionsschritt der Deacylierung durch Aminolyse katalysieren können. Die weitere Vorgehensweise aus Reinfektion von *E. coli*-Zellen und Amplifikation der angereicherten Varianten für weitere Selektionsrunden erfolgt dann wie für das klassische Phagen-Display beschrieben (s.o.).

Anhand der Verwendung dieser Selektionsstrategie zur Anreicherung optimierter Varianten aus einer Trypsilicase-Bibliothek mit fünf Randomisierungspositionen (S61, R62, Q64, S190, Q192) sollte deren Eignung zur praktischen Anwendung im Rahmen der Promotionsarbeit von Frau Dr. Gissel validiert werden. Effektiv konnte jedoch nur eine Selektionsrunde durchgeführt werden, da nach dieser bereits gehäuft Punkt- und *frameshift*-Mutationen auftraten und die Funktionalität des Phagenpools damit drastisch gesenkt wurde. Dieser Umstand wurde auf das Auftreten von *escape*-Mutanten zurückgeführt, welche durch ausbleibende oder

fehlerhafte Expression des für *E. coli* toxischen Hüllproteins p3 einen Wachstumsvorteil haben und sich dadurch unspezifisch anreichern (Paschke, 2006). Trotzdem konnten insgesamt fünf Varianten identifiziert werden, wovon zwei Varianten ein leicht verbessertes Verhältnis von Aminolyse zu Hydrolyse zeigten.

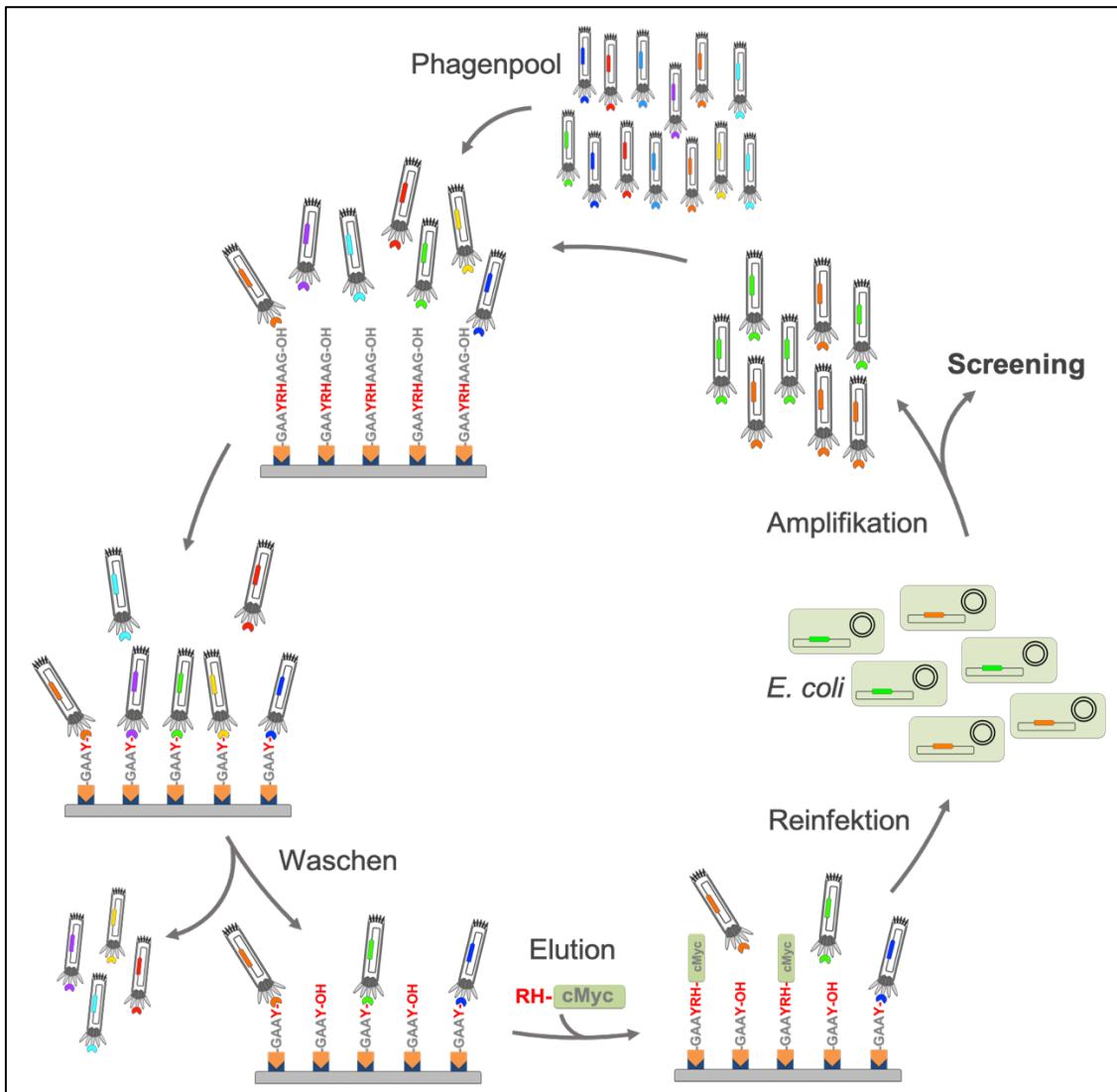


Abbildung 3: Direkte Selektion mittels Phagen-Display zur Optimierung der Trypsilicase. Dargestellt ist der schematische Prozessablauf einer Anreicherung von Trypsilicase-Varianten mit optimierten Syntheseeigenschaften aus einer randomisierten Bibliothek mittels Phagen-Display. Die randomisierte Bibliothek der Trypsilicase wird als Fusion mit dem p3 Hüllprotein auf der Phagen-Oberfläche präsentiert und bildet so den Phagenpool. Dieser wird zu dem immobilisierten Substrat mit YRH-Erkennungssequenz gegeben. Katalytisch aktive Varianten bilden nun ein Acyl-Enzym-Intermediat wodurch der Enzym-Phagen-Komplex kovalent immobilisiert wird. Ungebundene Phagen oder Varianten mit instabilem Acyl-Enzym-Intermediat werden durch Waschen entfernt. Phagen-Varianten-Kombinationen mit stabilem Acyl-Enzym-Intermediat werden durch Zugabe des peptidischen Nukleophils eluiert, da so die Deacylierung stattfinden kann, während nicht zu Deacylierung fähige Varianten an der Matrix verbleiben. Eluierte Phagen werden zur Reinfektion von *E. coli* eingesetzt und so amplifiziert. Diese angereicherten Varianten können nun einem Screening oder einer weiteren Selektionsrunde zugeführt werden.

Um die stark eingeschränkte Anwendbarkeit der Selektion mittels Phagen-Display zur Optimierung der Trypsiligase aufgrund der *escape*-Mutanten zu adressieren und diese Selektionsstrategie erfolgreich anwenden zu können, hat Herr Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)) im Rahmen seiner Promotionsarbeit verschiedene Optimierungsmaßnahmen angewendet. Diese Maßnahmen betrafen zum einen das Bibliotheksdesign, wobei hier durch die Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen anstatt von NNK-Motiven (siehe auch 1.2) und die Durchführung einer Leserahmenselektion sowohl Stoppcodone als auch *frameshift*-Mutationen vermieden wurden. So konnte die Qualität der Variantenbibliothek deutlich erhöht werden. Zum anderen hat Herr Dr. Böhme die Verwendung eines *tetA*-Promotor/Operators im Phagemid etabliert, wodurch eine Basalexpression des Fusionsproteins aus Trypsiligase-Variante und p3 Hüllprotein vermieden wird. Insgesamt ermöglichen diese Verbesserungen die Durchführung von vier Selektionsrunden unter Verwendung einer Trypsiligase-Bibliothek mit sechs Randomisierungspositionen (H40, A55, K97, L99, S190, Q192), wobei der Selektionsdruck von Runde zu Runde durch Reduzierung der Substrat- und Nukleophilenzonzentration, intensiveres Waschen und Verringerung der Elutionszeit erhöht wurde. Eine Anreicherung von *escape*-Mutanten konnte im Zuge dessen nicht beobachtet werden. Der Erfolg der getroffenen Maßnahmen spiegelte sich zudem in der identifizierten Trypsiligase-Variante 2G10 wider, deren Verhältnis von Aminolyse- zu Hydrolyseaktivität um ca. eine Größenordnung erhöht war. Folgerichtig wurde dieses Selektionssystem auch in dieser Arbeit angewendet.

1.5 Trypsiligase

Bei der Trypsiligase handelt es sich um eine Variante der Serinprotease Trypsin, welche sich von dem Wildtyp-Enzym um die vier Mutationen K60E, N143H, E151H und D189K unterscheidet (Liebscher, Schöpfel, et al., 2014). Dieser Biokatalysator wurde mit dem Ziel entwickelt, eine effiziente, vielseitig einsetzbare und ortsgerechtete Modifikation von Proteinen am *N*- und *C*-Terminus zu ermöglichen. Die Grundlage für diese Entwicklung wurde im Zuge der Promotionsarbeit von Frau Dr. Kathrin Rall in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Bordusa (MLU

Halle-Wittenberg) gelegt. Basierend auf der grundsätzlichen, mikroskopischen Reversibilität enzymatischer Reaktionen (Bergmann & Fraenkel-Conrat, 1938) und dem Substratmimetika-Konzept (Bordusa et al., 1997; Schellenberger et al., 1991) sollte hier eine Trypsin-Variante generiert werden, welche verbesserte Syntheseeigenschaften zeigt und eine effiziente Peptidligation ermöglicht. Aus einem umfangreichen, rationalen Enzym-Engineering resultierte hier die Trypsin-Variante K60E, D189K als das effizienteste Enzym, welches in Acyltransferreaktionen mit 4-Guanidinophenylester-basierten Substratmimetika und Modellpeptiden zwar Ausbeuten von über 90 % erreichte, jedoch bei der *N*-terminalen Modifikation einer Ribonuklease A nur 8,7 % Ausbeute generieren konnte. Dabei konnte jedoch keine Degradation der Ribonuklease A durch die Trypsin-Variante beobachtet werden, was im Gegensatz dazu für Wildtyp-Trypsin bereits gezeigt wurde (Rall, 2004). Anhand der durchgeföhrten Acyltransferreaktionen wurden hier außerdem Rückschlüsse auf die durch die eingeföhrten Mutationen erzielten Effekte getroffen. So führte die Mutation D189K zu einer veränderten Spezifität im S1-Bereich des Trypsins von basischen (Lysin, Arginin) hin zu aromatischen Seitenketten (Tyrosin) und zu einer verringerten Amidaseaktivität. Die Mutation K60E erhöhte zudem die Akzeptanz für die verwendeten Substratmimetika im S1'-Bereich und führte zu einer weiteren Verringerung der Amidaseaktivität zugunsten eines erhöhten Verhältnisses von Esterase- zu Amidaseaktivität.

Um die Syntheseeffizienz von Trypsin als Biokatalysator für eine *N*- und *C*-terminale Modifizierung von Proteinen zu steigern, hat Frau Dr. Sandra Liebscher (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg) im Zuge ihrer Promotionsarbeit die Trypsin-Variante K60E, D189K um die Mutationen N143H, E151H erweitert, was eine Metallionen-induzierte Spezifität für Peptidsubstrate mit Histidin in P2'-Position erzeugen und die Aminolyseaktivität steigern sollte (Liebscher, 2008; Willett et al., 1995, 1996). Die resultierende Trypsin-Variante K60E, N143H, E151H, D189K, welche später Trypsiligase getauft wurde (Liebscher, Schöpfel, et al., 2014), zeigte eine hohe Spezifität für die Aminosäuresequenz YRH und eine Abhängigkeit von Zink-Ionen. Unter Verwendung der Trypsiligase konnten quantitative Umsätze in Acyltransferreaktionen mit 4-Guanidinophenylester-basierten Substratmimetika und Modellpeptiden erreicht werden. Zudem konnte eine Reihe verschiedener

Proteine wie humanes Cyclophilin 18, Parvulin 10 aus *E. coli* oder humanes Pin1 unter Verwendung diverser Funktionalitäten und mit Ausbeuten von über 90 % am N-Terminus modifiziert werden.

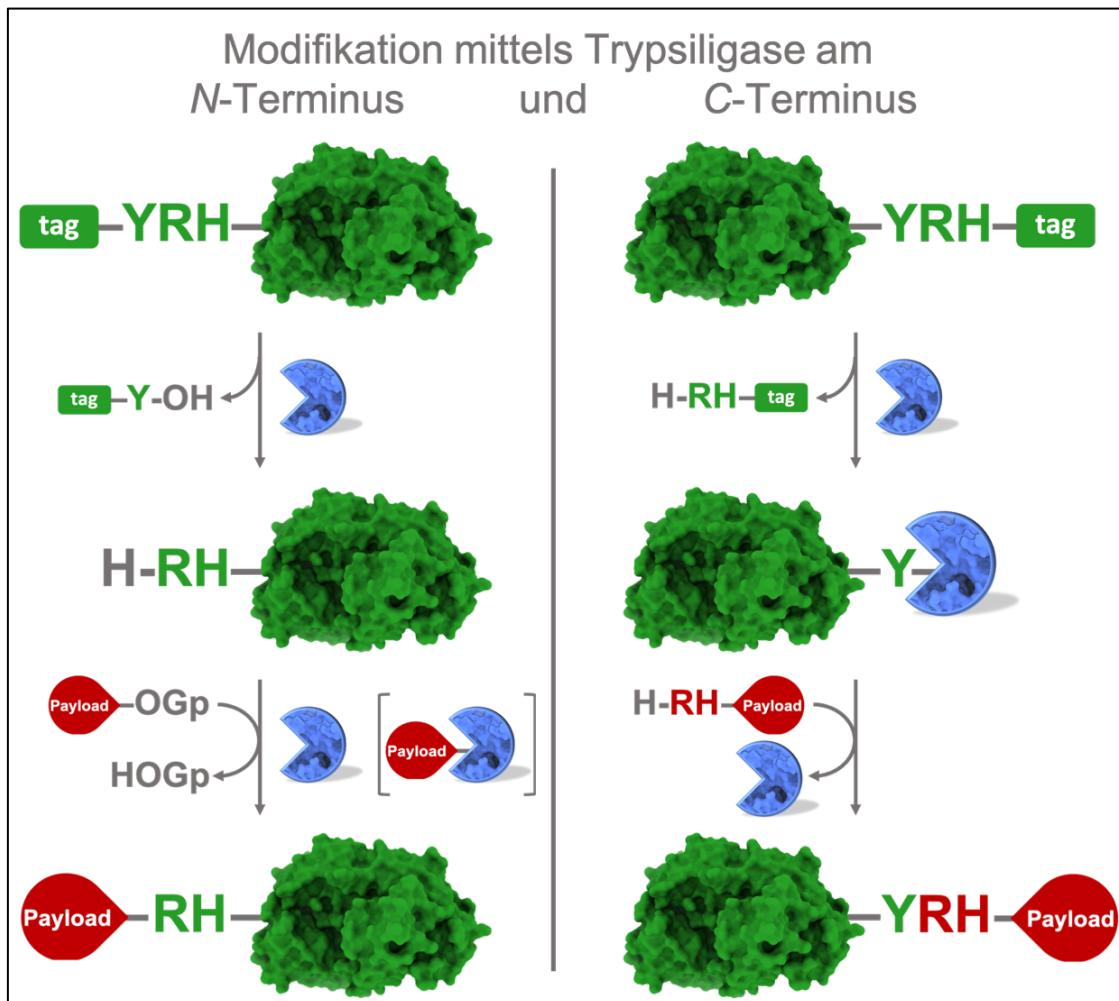


Abbildung 4: Funktionsprinzip der Trypsiligase-katalysierten Modifikation von Proteinen. Bei der N-terminalen Modifizierung (links) wird zunächst die Peptidbindung zwischen Tyrosin und Arginin in der Erkennungssequenz am N-Terminus des Zielproteins (grün) mittels Trypsiligase (blau) hydrolysiert. Durch Zugabe eines mit 4-Guanidinophenylester funktionalisierten *Payloads* (rot) kann das freigesetzte RH-Motiv in einer Acyltransferreaktion mittels Trypsiligase konjugiert werden. Der erste Schritt der C-terminalen Modifikation (rechts) ist ebenfalls die Spaltung der Y-R-Peptidbindung, bei der die Trypsiligase ein Acyl-Enzym-Intermediat mit der Carbonyl-Gruppe des Tyrosins bildet. Ein hinzugefügtes peptidisches Nukleophil mit N-terminaler RH-Sequenz, welches zuvor mit dem *Payload* funktionalisiert wurde, fungiert als Acyl-Akzeptor, was zur Deacylierung des Intermediats mittels Aminolyse und damit zur Modifikation des Proteins am C-Terminus führt.

Soll die Trypsiligase zur Modifikation eines Proteins am N-Terminus eingesetzt werden (Abbildung 4, links), wird die YRH-Erkennungssequenz dort gentechnisch eingeführt, wobei diese N-terminal um eine Affinitätsfusion, z.B. für eine Affinitätschromatografie, verlängert werden kann. Im ersten Schritt katalysiert die Trypsiligase hier die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung zwischen Tyrosin

und Arginin, was auf die native Hydrolyseaktivität zurückzuführen ist. Durch Zugebung eines 4-Guanidinophenylesters katalysiert die Trypsilicase nun eine Acyltransferreaktion. Dabei dient die Esterkomponente als Substratmimetikum, was in der Ausbildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates resultiert, während das 4-Guanidinophenol die Abgangsgruppe darstellt. In der anschließenden Deacylierung fungiert das RH-Motiv am freien N-Terminus des Zielproteins als Acylakzeptor. So wird eine Säureamidbindung geknüpft, die keine YRH-Erkennungssequenz aufweist, wodurch eine Sekundärhydrolyse hier ausgeschlossen ist und quantitative Produktausbeuten erreicht werden. Neben den bereits genannten Anwendungsbeispielen wurde die Effizienz dieser Modifikationsstrategie auch bereits an Rezeptoren wie EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) oder CD147 auf der Oberfläche lebender Zellen demonstriert (Liebscher et al., 2021; Liebscher, Schöpfel, et al., 2014; Meyer et al., 2016).

Die C-terminale Modifikation mittels Trypsilicase verläuft hingegen über eine ortsspezifische Transamidierungsreaktion (Abbildung 4, rechts). Hier kommt es zunächst ebenfalls zur Spaltung der Peptidbindung zwischen Tyrosin und Arginin, wobei eine kovalente Bindung zwischen dem aktiven Serin 195 und der Carbonylfunktion des Tyrosins gebildet wird, wodurch ein Acyl-Enzym-Intermediate entsteht. Anstelle einer hydrolytischen Spaltung dieses Intermediats durch ein Wassermolekül als Nukleophil, wie es bei Wildtyp-Trypsin der Fall wäre, katalysiert Trypsilicase vorzugsweise eine Aminolyse. Ein dem Ansatz hinzugefügtes Peptid mit N-terminalem RH-Motiv, welches zuvor mit der gewünschten Funktionalität konjugiert wurde, agiert hier anhand der freien Aminogruppe am N-Terminus als Nukleophil. In der Folge kommt es zur Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediats durch Aminolyse, wodurch eine neue Peptidbindung zwischen dem C-terminalem Tyrosin des Proteins und dem Arginin am N-Terminus des hinzugefügten Peptides entsteht. Mit dieser Methode wurde eine Vielzahl von Funktionalitäten wie Polymere, Toxine, Click-Anker und Fluoreszenzfarbstoffe an Fab-Fragmente verschiedener Spezifitäten konjugiert (Liebscher, Kornberger, et al., 2014; Meyer et al., 2016).

Eine wesentliche Einschränkung der C-terminalen Proteinmodifikation mittels Trypsilicase ergibt sich aus der Neubildung der Erkennungssequenz YRH im

Aminolyseprodukt und einer verbleibenden, nativen Hydrolyseaktivität des Enzyms. Diese beiden Faktoren führen sowohl zu einer primären Hydrolyse des Eduktes, als auch zu einer sekundären Hydrolyse des Produktes, was die erreichbare Ausbeute stark limitiert. Hinzu kommt, dass auch die Rückbildung des Eduktes möglich ist, wenn das Aminolyseprodukt wieder als Substrat agiert und es zur Aminolyse des Acyl-Enzym-Intermediats durch das RH-Motiv tragende Peptid kommt, welches vom Eduktprotein in einer vorrangegangenen Transamidierungsreaktion abgespalten wurde. Dadurch ist die erreichbare Ausbeute in der Transamidierung auch von dem eingesetzten Überschuss an Nukleophil-Peptid abhängig. So konnten im Zuge der C-terminalen Modifikationen von Proteinen, wie beispielsweise Fab-Fragmenten, nur Ausbeuten von maximal 39 % erreicht werden, was auf die genannten Faktoren zurückzuführen ist (Liebscher, 2008). Hier existiert dementsprechend ein Potential zur Optimierung der Syntheseeffizienz einer Trypsiligase-katalysierten Proteinmodifikation am C-Terminus. Dabei ist das Verhältnis von Aminolyse- zu Hydrolyseaktivität entscheidend, welches zugunsten der Aminolyse verändert werden muss, um einen optimierten Biokatalysator zu erhalten.

1.6 Ortsspezifische Proteinmodifikation und ADCs

Es gibt eine Vielzahl praktischer Anwendungen von Proteinkonjugaten, die sich über diverse Bereiche wie Lebensmittel, Textilien, Biomaterialien und pharmazeutische Industrie erstrecken (Milczek, 2018). Insbesondere in den Bereichen Therapeutika und Diagnostik gibt es zahlreiche Beispiele für Proteine, die mit verschiedenen Molekülen oder Funktionalitäten wie Toxinen (Chari et al., 2014), Polymeren (Y. Wang & Wu, 2018), Oligonukleotiden (Dovgan et al., 2019), Polysacchariden (Ferguson et al., 2020), Nanopartikeln (Spicer et al., 2018) oder sogar anderen Proteinen (Baalmann et al., 2020; Voigt et al., 2022) modifiziert wurden. Aus diesen unterschiedlichen Kombinationen von Proteinen und Funktionalitäten ergibt sich eine entsprechend breite Palette von Anwendungsmöglichkeiten. Darüber hinaus ist die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen zur Verfolgung in Echtzeit eine sehr verbreitete Methode in den Biowissenschaften (Krall et al., 2016).

Ein wesentlicher Punkt bei der Proteinmodifikation ist natürlich die Erhaltung der Funktion des Proteins. Insbesondere der Ort der Modifikation und die Größe der eingeführten Funktionalität haben hier einen entscheidenden Einfluss (Hoyt et al., 2019). Entsprechend hoch ist der Bedarf an ortsspezifischen Modifikationsmethoden, die homogene Biokonjugate ergeben. Dies gilt insbesondere für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (engl. *antibody-drug conjugates*; ADCs). Diese Biopharmazeutika werden vor allem in der Krebstherapie eingesetzt und bestehen aus drei wesentlichen Komponenten: dem Antikörper, einem Toxin und einem Linker, der die beiden ersten kovalent miteinander verbindet. Das Konzept der ADCs besteht darin, dass der Antikörper gezielt zytotoxische Wirkstoffe zu tumorassoziierten Antigenen transportiert. Auf diese Weise werden Krebszellen oder solide Tumore selektiv angegriffen, während gesundes Gewebe geschont wird. Dadurch wird das therapeutische Fenster im Vergleich zur klassischen Chemotherapie erheblich erweitert (Birrer et al., 2019).

Frühe Konjugationstechnologien zur Herstellung von ADCs basierten auf chemischen Methoden unter Verwendung von Lysin- und Cystein-Seitenketten (Drachman & Senter, 2013). Rund 30 Jahre ADC-Forschung haben jedoch eindrucksvoll gezeigt, dass heterogene Produktgemische, die mit klassischen chemischen Methoden hergestellt werden, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Sicherheit stark limitiert sind (Walsh et al., 2021). Neben anderen erfolgskritischen Faktoren, wie der Auswahl des richtigen Antigens, Antikörpers, Toxins und Linkers, ist auch das verwendete Konjugationsverfahren entscheidend (Beck et al., 2017). Dies wird zusätzlich durch die Tatsache unterstrichen, dass sowohl der Ort der Modifikation am Antikörper als auch die Anzahl der konjugierten Wirkstoffmoleküle einen erheblichen Einfluss auf das pharmakokinetische Profil eines ADC haben (Hamblett et al., 2004; Strop et al., 2015). Daraus ergibt sich folgerichtig ein Bedarf an ortsspezifischen Technologien für die Herstellung von ADCs, die eine vollständige Kontrolle über die oben genannten Punkte ermöglichen.

Um dieser Nachfrage gerecht zu werden, wurden einerseits chemische Methoden weiterentwickelt, die kontrollierte und ortsspezifische Veränderungen ermöglichen. Eine sehr verbreitete und bekannte Technologie verwendet artifizielle Cysteine und wird THIOMAB genannt. Die Cysteine werden durch genetische

Modifikation eingefügt und dann mit klassischer Maleimid-basierter Chemie modifiziert (Junutula et al., 2008). Eine Methode die stattdessen die vorhandenen Cysteine der interchenaren Disulfidbrücken nutzt, wird Disulfid-Neuverbrückung genannt. Dabei werden bis-reaktive Verbindungen verwendet, um die zuvor reduzierten Disulfidbrücken wieder zu verbinden und das Toxin einzuführen. Bissulfone (Badescu et al., 2014; Bryant et al., 2015), Maleimide der nächsten Generation (Behrens et al., 2015; Schumacher et al., 2014) und Pyridazindione (Maruani et al., 2015; Robinson et al., 2017) werden dabei häufig eingesetzt. Andere Technologien konzentrieren sich auf die Verwendung von nicht-kanonischen Aminosäuren. Sie werden durch eine Erweiterung des genetischen Codes in die Antikörper eingebaut (C. C. Liu & Schultz, 2010; Young & Schultz, 2010), während die Konjugation z.B. durch Oxim-Ligation (Axup et al., 2012), Azid-Alkin-Cycloaddition (Ahn et al., 2020) oder Diels-Alder-Cycloaddition (St. Amant et al., 2019) erfolgt. Ein recht neuer und innovativer Ansatz ist die Verwendung von Affinitätspeptiden für die Herstellung von ADCs. Diese Peptide binden, ähnlich wie Protein G oder A, an bestimmte Regionen des Antikörpers. Integrierte reaktive Gruppen bewirken anschließend eine kovalente Modifikation an der Bindungsstelle (Matsuda et al., 2020; Yamada et al., 2019).

Als Alternative zu den genannten chemischen Methoden wurden auch einige enzymatische Techniken zur ortsspezifischen Modifizierung von Antikörpern entwickelt. Schließlich liegt diese Entwicklung auf der Hand, da Enzyme aufgrund ihrer intrinsischen Chemo- und Regioselektivität ein hohes Maß an Kontrolle in Bezug auf die Modifizierungsstelle und den Beladungsgrad bieten, was einerseits die Herstellung homogener ADCs erleichtert (van Berkel & van Delft, 2018), aber auch andere komplexe antikörperähnliche Konstrukte wie bispezifische Formate zugänglich macht (Voigt et al., 2022). Zudem funktionieren Enzyme unter sehr milde Reaktionsbedingungen. Die bakterielle Transglutaminase ist hier ein prominentes Beispiel. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen der γ -Carbamoylgruppe einer Glutaminseitenkette und einer primären Aminogruppe (z. B. Lysin). Diese Reaktivität wurde genutzt, um Antikörper über eine genetisch eingeführte LLQGA-Erkennungssequenz (Strop et al., 2013, 2015) oder das native Glutamin 295 nach Deglykosylierung (Dennler et al., 2014; Jeger et al.,

2010) zu modifizieren und ADCs zu erzeugen. Sortase A ist ein weiteres Beispiel für einen solchen Biokatalysator. Es erkennt die Peptidsequenz LPETG und katalysiert eine Transpeptidierung in Anwesenheit eines Peptid-Nukleophils mit N-terminaler Oligoglycin-Sequenz (Popp et al., 2007). Dieser Ansatz wird von der NBE Therapeutics AG erfolgreich als SMAC-Technologie vermarktet und für die ADC-Produktion eingesetzt (D'Amico et al., 2019; Stefan et al., 2017). Eine weitere enzymbasierte Technologie namens SMARTag wird von Catalent vermarktet und leitet sich von dem Formylglycin-erzeugenden Enzym (FGE) ab. Dieser Biokatalysator oxidiert das Cystein der Erkennungssequenz CXPXR zu einem Formylglycin, das eine Aldehydkomponente trägt. Diese Reaktion kann *in vivo* durch Koexpression des FGE durchgeführt werden, woraufhin die Aldehydgruppe mit einer beliebigen Funktionalität mittels Hydrazino-Pictet-Spengler-Ligation konjugiert werden kann (Agarwal et al., 2013; Rabuka et al., 2012). Mit dieser Technologie wurden bereits verschiedene ADCs hergestellt (Barfield et al., 2020; Drake et al., 2018). Da IgG-Antikörper ein Glykosylierungsmuster tragen, wurde auch dieses Strukturmerkmal für eine gezielte enzymatische Modifikation genutzt. GlycoConnect ist eine von Synaffix BV entwickelte enzymatische Technologie. Dabei wird die Glykankette zunächst mit Hilfe von Endoglykosidase bis zum terminalen N-Acetylglucosamin abgespalten. Dann wird ein azidomodifiziertes N-Acetylgalactosamin unter Verwendung einer Glycosyltransferase konjugiert, das anschließend mittels Click-Chemie funktionalisiert werden kann (van Geel et al., 2015; Verkade et al., 2018).

Jede der aufgeführten Technologien hat ihre Vor- und Nachteile, wobei die Nachteile oft auch auf die inhärenten Eigenschaften einer Technologie zurückzuführen sind. Daraus ergibt sich ein ständiger Bedarf an neuen, effizienten und möglichst flexiblen Technologien zur ortsspezifischen Modifizierung von Antikörpern.

1.7 Zielstellung

Das übergeordnete Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist die Optimierung der Trypsiligase hinsichtlich der Syntheseeffizienz in der C-terminalen Proteinmodifikation. Dafür soll ein semi-rationales Enzymdesign angewendet werden, welches aus den folgenden drei Komponenten zusammengesetzt ist. Zunächst soll eine

randomisierte Bibliothek auf Basis des Gens der Trypsiligase generiert werden, wobei unter Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen zur Randomisierung eine möglichst hohe Qualität sichergestellt werden soll. Daraufhin werden verbesserte Varianten mittels Phagen-Display und unter Verwendung der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Bordusa (MLU Halle-Wittenberg) etablierten Selektionsstrategie angereichert. Die Identifikation optimierter Varianten erfolgt daraufhin anhand eines ELISA-basierten Hochdurchsatzscreenings im Mikrotiterplatten-Format. Für dieses Screening soll im Rahmen dieser Arbeit auch die Biosynthese der Trypsiligase-Varianten im Mikrotiterplatten-Format validiert werden.

Nach Selektion und Screening sollen die Gene der identifizierten und potentiell optimierten Varianten zunächst sequenziert werden, um Informationen über die vorliegenden Aminosäureaustausche zu erhalten. Daraufhin erfolgt die Biosynthese der Einzelvarianten im größeren Maßstab, um sie einer primären Charakterisierung hinsichtlich maximal erreichbarer Ausbeute und dem Verhältnis von Aminolyse- zu Hydrolyseaktivität unter Verwendung von Peptidsubstraten in einer Modellreaktion zu unterziehen. Die auf Grundlage dieser Daten vielversprechendste Trypsiligase-Variante soll anschließend in einer detaillierten Charakterisierung hinsichtlich ihrer enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} , der Syntheseeffizienz, der Abhängigkeit von der Konzentration an Zink-Ionen und der Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht werden.

Letztendlich soll auch die praktische Anwendbarkeit der generierten Trypsiligase-Varianten anhand eines praxisorientierten Beispiels validiert werden. In Anlehnung an die enzymatische Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten soll hier das Fab-Fragment eines etablierten und therapierelevanten Antikörpers wie Trastuzumab als Modellprotein für eine C-terminale Modifikation verwendet werden. Hier soll die Syntheseeffizienz anhand von Produkt-Zeit-Kurven verifiziert und durch den Reaktionsverlauf begleitende LC/MS-Analytik sichergestellt werden, dass die Modifikation ortsspezifisch und ohne Nebenprodukte stattfindet. Unter Verwendung eines konzentrationsabhängigen ELISA soll zudem überprüft werden, ob die Bindungsfunktionalität des Fab-Fragments durch die Modifikation beeinträchtigt wird.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, insofern nicht anders angegeben, mindestens mit dem Reinheitsgrad *zur Analyse* von einem der folgenden Anbieter bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), VWR International GmbH (Darmstadt).

2.2 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Oligonukleotide wurden entsalzt und lyophilisiert von Life Technologies GmbH bzw. Thermo Fisher Scientific GmbH (Darmstadt) bezogen.

Tabelle 2: Übersicht der Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
LibRW_SF_fwd	CTACATACCGGTGCCATGGCCATTGTTGGTGGTTATAC
LibRW_SF_rev	GCTAGAACGCGTCTCAAAGTTGGGTGTTGATG
LibRW_IF_fwd	GTCAGCACCGGTCTCAACGATATCATGCTGATC
LibRW_IF_rev	GCTAGAACGCGTCTCAACGATAACCCTGCAGTT
LibRW_EF_fwd	GAATGTACCGGTCTCCTGCCGGATAATCCGGGTG
LibRW_EF_rev	GTACGTACGCGTGTACCGCTACCGGATCC
LibRW_RF_anti	GTGAATACCACCGCGTCTC
ModLibs_fwd	CCAGACTTACGCTCCAATTC
ModLibs_rev	TCTGCGTTAACCGAGACTAC
Seq_pelB_pMB	CTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTG
pPICZ_MW_fwd	GTGGTGGTAGCCTGATCAAC
pPICZ_MW_rev	GTTGGCTGCAATGGTGTCTG
pPICZ_BsaI_fwd	AGCCTACATGGTCTCCTCGAGAAAAGGATTGTTGGTGGT-TATACCTGTC

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
pPICZ_BsaI_rev	GTGAATACCGGTCTCACCGGTTATTAGTTGGCTGCAAT-GGTGTCCTG
pPICZ_seq_fwd	GCTCCAGTCAACACTACAACAG
PIB4_4Tn_rev	CGTACGACCGGTTATTAGTTGGCTGCAATGGTGTCCCTG

Für die Bibliothekskonstruktion wurden randomisierte Oligonukleotide von Ella Biotech GmbH (Martinsried) bezogen. Diese wurden mittels HPLC gereinigt und lyophilisiert geliefert. Die Randomisierung an den mit NNN gekennzeichneten Positionen erfolgte unter der Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen, wobei ausschließlich 19 verschiedene Codone für 19 kanonische Aminosäuren (kein Cystein) zugelassen wurden.

Tabelle 3: Übersicht der randomisierten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
LibRW_RF1.3_sense	AGCCTACATACCGGTCTCAACTT <u>NNNNNN</u> AAA <u>ACTNN</u> - <u>NAACAA</u> CGATGAGACGC <u>GTGGT</u> ATT <u>CAC</u>
LibRW_RF2.3_sense	AGCCTACATACCGGTCTCAT <u>CGTTNNNTGGGTTATNNNT</u> - <u>GTNNN</u> CTGCCGGAGACGC <u>GTGGT</u> ATT <u>CAC</u>

2.3 Plasmide

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten oder generierten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften/Verwendung	Quelle
pMA_4Tn-cuo-lib	Klonierungsvektor, für die Codonverwendung von <i>E. coli</i> optimiertes Gen der Trypsinligase, Amp ^R , ColE1 ori	Geneart AG (Regensburg)
pInSAlect_NWG-1	Plasmid für die Leserahmenselektion, Tat-Signalsequenz, β-Lactamase-Gen (TEM-1), Cm ^R , ColE1 ori	Sven Pfeifer (NWG Künstl. Bindepoteine, MLU Halle-Wittenberg)
pMB04_sfGFP	<i>Phagemid</i> , Tetracyclin-Promotor, pelB-Signalsequenz, sfGFP-Gen, <i>amber</i> -Stopcodon, ΔpIII, Amp ^R , Tet ^R , ColE1 ori, f1 ori	Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg)

Bezeichnung	Eigenschaften/Verwendung	Quelle
pMB04_LibRW_1.6	pMB04-Phagemid mit randomisierter Trypsiligase-Bibliothek	diese Arbeit
pMB04_LibRW_1.6_Out_Rd1-4	pMB04 mit Trypsiligase-Bibliothek als Output nach 1-4 Phagen-Display Selektionsrunden	diese Arbeit
pPICZαA	Expressionsvektor für <i>P. pastoris</i> X33, AOX1 Promotor, α-Faktor-Sekretionssignal, MCS, Myc-Tag, His6-Tag, AOX1 Terminator, TEF1 Promotor, EM7 Promotor, Bleo ^R , CYC1 Terminator, Cole1 ori	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
pPICZαA_LibRW_1.6_Out_Rd4	pPICZαA-Expressionsvektor mit Trypsiligase-Bibliothek als Output nach vier Phagen-Display Selektionsrunden	diese Arbeit
pPICZαA_4Tn/Variante	pPICZαA-Expressionsvektor mit Gen für Trypsiligase bzw. Trypsiligase-Variante	diese Arbeit
pASK_αHer2-TAAVRH-cMyc	Expressionsvektor pASK-IBA7plus (Tet-Promotor/Repressor, Amp ^R , f1 ori) für <i>E. coli</i> mit Gen für Her2-spezifisches Fab-Fragment mit C-terminaler AAYRHAAG-cMyc Aminosäuresequenz an der schweren Kette	Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg)
pASK_αHer2-TAALRH-cMyc	Expressionsvektor pASK-IBA7plus (Tet-Promotor/Repressor, Amp ^R , f1 ori) für <i>E. coli</i> mit Gen für Her2-spezifisches Fab-Fragment mit C-terminaler AALRHAAG-cMyc Aminosäuresequenz an der schweren Kette	Franziska Becker (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg)

2.4 Mikroorganismen und Bakteriophagen

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen aufgelistet.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen und Bakteriophagen

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> ElectroTen-Blue*	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> <i>lac Kan^R [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG (Walldbronn)
<i>E. coli</i> 10-beta*	$\Delta(ara-leu)7697 araD139 fhuA \Delta lacX74$ <i>galK16 galE15 e14- φ80dlacZΔM15 recA1</i> <i>endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

Material

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> 5-alpha**	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44</i> <i>φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1</i> <i>endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
<i>E. coli</i> ER2738*	[F'proA+B+ <i>lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10</i> (Tet ^R)] <i>fhuA2 glnVΔ(lac-proAB) thi-1</i> <i>Δ(hsdS-mcrB)5</i>	Lucigen Corp. (Middleton, WI, USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)**	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]</i> <i>ΔhsdS (λ DE3 = λ sBamH1o ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Bakteriophage M13KO7	-	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
<i>P. pastoris</i> X33	Wildtyp	Life Technologies GmbH (Darmstadt)

* Zellstämme wurden als elektrokompetente Präparationen von den Herstellern bezogen

** *E. coli* 5-alpha und BL21 (DE3) wurden als chemokompetente Präparation bezogen

2.5 Nährmedien

Alle in Tabelle 6 aufgeführten Nährmedien wurden unter Verwendung von ddH₂O hergestellt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die Antibiotika wurden den Medien vor Verwendung und bei Bedarf in den Tabelle 7 zu entnehmenden Konzentrationen zugesetzt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar
LBLS-Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
LBLS-Agar	LBLS-Medium mit 15 g/l Agar
2xYT-Medium	16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
2xYT-Agar	2xYT-Medium mit 15 g/l Agar
YPD-Medium	10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Pepton, 20 g/l D-Glucose
YPD-Agar	YPD-Medium mit 20 g/l Agar

Material

Bezeichnung	Zusammensetzung
YPDS-Agar	YPD-Agar mit 1 M Sorbitol
BMD-Medium	50 mM MES-Puffer, pH 6,0; 13,4 g/l Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren); 20 g/l D-Glucose
BMM-Medium	50 mM MES-Puffer, pH 6,0; 13,4 g/l Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren); 10 ml/l Methanol

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antibiotika

Antibiotika	$c_{\text{Stammlsg.}} [\text{mg/ml}]$	$c_{\text{Medium}} [\mu\text{g/ml}]$
Ampicillin*	100	100
Anhydrotetracyclin**	2	0,02-0,2
Carbenicillin*	50	50-100
Kanamycin*	50	50
Zeocin***	100	25 (für <i>E. coli</i>) / 100 (für <i>P. pastoris</i>)

* Stammlösung in ddH₂O; ** Stammlösung in Ethanol abs.; *** gebrauchsfertige Stammlösung von InvivoGen (Toulouse, Frankreich) bezogen

2.6 Enzyme und Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Proteine sind in Tabelle 8 aufgelistet. Ausgenommen sind hier die im Zuge dieser Arbeit generierten Varianten der Trypsiligase und die Trypsiligase selbst.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Enzyme und Proteine

Bezeichnung	Quelle
Für molekularbiologische Arbeiten	
Q5® High-Fidelity DNA Pol. (2 U/μl)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Klenow-Fragment, DNA Pol. I (5 U/μl)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Restriktionsenzyme:	
Agel HF (20 U/μl), BamHI HF (20 U/μl), BsaI HF (20 U/μl), BssSI (10 U/μl), DpnI (20 U/μl), Esp3I (10 U/μl), MluI (10 U/μl), NcoI HF (20 U/μl), SacI HF (20 U/μl), ScaI HF (20 U/μl), XhoI (20 U/μl)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

Material

Bezeichnung	Quelle
FastAP (1 U/ μ l)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
T4 DNA Ligase (400 U/ μ l)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
ELISA-basiertes Screening	
α -c-Myc-Antikörper, Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
α -Maus-IgG (Fc-spezifisch)-HRP-Antikörper, Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
C-terminale Modifikation des αHer2-Fab-Fragments	
α Her2-Fab-TAAYRH-cmcy	diese Arbeit
α Her2-Fab-TAALRH-cmcy	Julia Simon (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg)
Funktionsanalyse mittels ELISA	
Humane Ektodomäne des Her2-Rezeptors (rekombinant; 100 ng/ μ l)	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
α -Human-IgG (Fab-spezifisch)-HRP-Antikörper, Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

2.7 Referenzstandards, Kits und Reagenzien

Tabelle 9 zeigt die verwendeten Referenzstandards, Kits und Reagenzien.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Referenzstandards, Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Quelle
Für molekularbiologische Arbeiten	
<i>Ultra Low Range DNA Ladder</i> (10-300 bp)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
<i>GeneRuler 100 bp DNA Ladder</i> (100-1.000 bp)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
<i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i> (75-20.000 bp)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
<i>NucleoSpin Plasmid EasyPure</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)

Bezeichnung	Quelle
<i>NucleoSpin Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
dNTPs Mix (10 mM)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
SYBR Safe Gel-Färbemittel (10.000x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Für proteinbiochemische Arbeiten	
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa</i>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
ELISA	
TMB ONE	Kementec Solutions A/S (Taastrup, Dänemark)

2.8 Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide sind unter Angabe der Aminosäuresequenzen und dem Molekulargewicht in Tabelle 10 aufgelistet. Alle Peptide wurden freundlicher Weise von Steffanie Kaufmann, Bianka Hartrodt oder Christoph Meyer (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg) mittels Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield (1963) synthetisiert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Reinheit (>90 %) und die Identität aller Peptide wurde mittels UPLC bei 220 nm und Massenspektrometrie verifiziert.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Peptide

Aminosäuresequenz	<i>M</i> [g/mol]
Substrat-Peptide	
Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH	1244,38
Bz-AAYRHAAG-OH	919,99
Bz-AALRHAAG-OH	869,97
Bz-AAFRHAAG-OH	903,99
Bz-AAWRHAAG-OH	943,03
Bz-AARRHAAG-OH	913,00

Material

Aminosäuresequenz	M [g/mol]
Bz-AAARHAAG-OH	827,89
Bz-AADRHAAG-OH	871,90
Bz-AAYKHAAG-OH	891,98
Bz-AAYDHAAG-OH	878,89
Bz-AAYRDAAG-OH	897,94
Bz-AAYRNAAG-OH	896,96
Bz-AAYRAAAG-OH	853,93
Nukleophil-Peptide	
H-RHAAGEQKLISEEDL-OH	1695,83
H-RHAK-OH	510,59
H-KHAK-OH	482,58
H-RHAK(FAM)-OH	868,91
H-RHAK(MCC-DM1)-OH	1468,01

2.9 Puffer und Lösungen

In Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer unter Verwendung von ddH₂O hergestellt und mittels 0,22 µm oder 0,45 µm Filterpapier bzw. Spritzenvorsatzfilter filtriert.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Quelle
Für molekularbiologische Arbeiten	
Q5® Reaktionspuffer (5x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
NEB-Puffer 2 (10x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
CutSmart® Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
NEB-Puffer 3.1 (10x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

Material

Bezeichnung	Zusammensetzung/Quelle
Gel-Ladepuffer Orange (6x)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
TAE-Puffer	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA pH 8,2
Für proteinbiochemische Arbeiten	
Protein G-Affinitätschromatografie:	
Zellaufschlusspuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ ; 0,1 mM AEBSF; pH 7,0
Bindespuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,0
Elutionspuffer	100 mM Glycin-HCl; pH 2,7
Neutralisierungspuffer	1 M TRIS-HCl; pH 9,0
Kationenaustausch-Chromatografie:	
Bindespuffer	20 mM Natriumacetat; pH 3,5
Elutionspuffer	20 mM Natriumacetat; 1 M NaCl; pH 3,5
Größenausschluss-Chromatografie:	
SEC-Laupuffer	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 (bei 30 °C)
SDS-PAGE:	
3x SDS-Probenpuffer	250 mM TRIS-HCl; 60 g/l SDS; 1,5 g/l Bromphenolblau; 300 ml/l Glycerin; 150 ml/l 2-Mercaptoethanol (optional); pH 6,8
Elektrophoresepuffer	3 g/l TRIS-HCl; 14,4 g/l Glycin; 1 g/l SDS; pH 8,3
Selektion mittels Phagen-Display	
PEG/NaCl-Lösung	300 g/l PEG 4000; 2,5 M NaCl
Puffer T	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 (bei 30 °C), steril
Puffer TT0,1	Puffer T; 1 ml/l Tween 20
Casein Blocking Buffer 10x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
ELISA-basiertes Screening	
Puffer T	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 (bei 30 °C)

Material

Bezeichnung	Zusammensetzung/Quelle
Stopp-Puffer	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA; pH 3
TBS-Puffer	50 mM TRIS-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,4
TBST0,05-Puffer	TBS-Puffer; 0,5 ml/l Tween 20
Charakterisierung optimierter Trypsilinase-Varianten	
Puffer T	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 (bei 30 °C)
C-terminale Modifikation des αHer2-Fab-Fragments	
Puffer T	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 (bei 30 °C)
Funktionsanalyse mittels ELISA	
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBST0,05	PBS; 0,5 ml/l Tween 20
Blockierungspuffer	PBST0,05; 30 g/l BSA

2.10 Sonstige Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chromatografie-Säulen, Zentrifugalkonzentratoren, magnetischen Beads und Mikrotiterplatten sind als sonstige Materialien in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Übersicht der sonstigen Materialien

Bezeichnung	Quelle
Chromatografie-Säulen:	
HiTrap Protein G HP 1 ml	Cytiva Europe GmbH (Freiburg)
HiTrap SP FF 1 ml	Cytiva Europe GmbH (Freiburg)
HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	Cytiva Europe GmbH (Freiburg)
MAbPac™ RP Säule (Phenyl; 2,1 mm x 50 mm)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Säule (300 Å; 1,7 µm; 2,1 mm x 50 mm)	Waters GmbH (Eschborn)

Material

Bezeichnung	Quelle
ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Vorsäule (300 Å; 1,7 µm; 2,1 mm x 5 mm)	Waters GmbH (Eschborn)
ACQUITY UPLC BEH C8 Säule (130 Å; 1,7 µm; 2,1 mm x 50 mm)	Waters GmbH (Eschborn)
Zentrifugalkonzentratoren:	
Microcon-10 kDa Zentrifugen-Filtiereinheit mit Ultracel®-10 Membran	Merck KGaA (Darmstadt)
Amicon® Ultra-4 10 kDa Zentrifugen-Filtiereinheit	Merck KGaA (Darmstadt)
MultiScreen® 96-well Ultrafiltration Plate mit Ultracel®-10 Membran	Merck KGaA (Darmstadt)
Magnetische Beads:	
Dynabeads™ M-270 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Mikrotiterplatten:	
Microplatte 96-well PP V-Boden	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Microplatte 96-well PS F-Boden	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96 Deep-Well Plate 2 ml	SP Bel-Art (Wayne, NJ, USA)
Pierce™ Streptavidin-beschichtete 8-well Streifen, PS, klar	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Pierce™ Streptavidin-beschichtete HBC Platten, 384-well, PS, klar	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Nunc MediSorp™ 96-well Platten	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

2.11 Geräte

In Tabelle 13 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Quelle
NanoPhotometer™	Implen GmbH (München)
LabelGuard™	Implen GmbH (München)

Material

Bezeichnung	Quelle
ÄKTAprime plus	Cytiva Europe GmbH (Freiburg)
ACQUITY UPLC-System	Waters GmbH (Eschborn)
Q-TOF Premier™ Massenspektrometer	Waters GmbH (Eschborn)
QPix 2 <i>Colony Picker</i>	Molecular Devices LLC. (San Jose, CA, USA)
SpectraMax® Paradigm® MTP-Reader	Molecular Devices LLC. (San Jose, CA, USA)
Sunrise™ Plattenleser	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte unter Verwendung des Kits *NucleoSpin Plasmid EasyPure* von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) nach Herstellerangaben. Für die Elution der DNA wurden 20-50 µl steril filtriertes ddH₂O je Präparation verwendet.

3.1.2 Isolierung genomicscher DNA aus *P. pastoris*-Zellen

Um die Gene von Trypsiligase-Varianten aus *P. pastoris*-Zellen amplifizieren zu können, wurde die genomicsche DNA nach Löoke, Kristjuhan & Kristjuhan (2011) präpariert und für eine anschließende PCR (siehe 3.1.3) eingesetzt.

3.1.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Amplifikation mittels PCR erfolgte ausschließlich unter Verwendung der Q5® *High-Fidelity* DNA Polymerase von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) nach Herstellerangaben. Soweit nicht anders angegeben, wurde für eine Ansatzgröße von 50 µl 10-50 ng Template-DNA eingesetzt. Die Aufreinigung der Ansätze erfolgte anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.8).

3.1.4 Synthese doppelsträngiger DNA mittels Klenow-Fragment

Da die von Ella Biotech GmbH (Martinsried) bezogenen randomisierten Oligonukleotide (siehe 2.2) als einzelsträngige DNA vorlagen, mussten diese im Zuge der Bibliothekskonstruktion doppelsträngig aufgefüllt werden. Hierzu wurden 25 pmol der randomisierten Oligonukleotide mit 25 pmol LibRW_RF_anti und 2 µl NEB-Puffer 2 versetzt und mit ddH₂O auf 18,5 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 95 °C inkubiert und daraufhin auf 25 °C mit einer Temperaturrampe von 1 K/min abgekühlt. Nun wurden dem Ansatz 0,5 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl 5 U/µl Klenow-Fragment hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 25 °C und weitere 30 min bei 75 °C. Die Ansätze wurden direkt für einen anschließenden Restriktionsverdau mit AgeI/MluI eingesetzt.

3.1.5 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten oder Plasmiden

Für den Restriktionsverdau wurden 0,5-10 µg DNA mit 5-40 U der jeweiligen Restriktionsenzyme (siehe 2.6) und dem geeigneten Puffer (nach Herstellerangaben) versetzt und mit ddH₂O auf 40-80 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Handelte es sich bei der DNA um ein Plasmid, wurden dem Ansatz außerdem 0,5 U FastAP zugesetzt. Die Ansätze wurden 4-18 h bei 37 bzw. 55 °C (je nach Restriktionsenzym; nach Herstellerangaben) inkubiert. Durch Inkubation für 20 min bei 80 °C wurden die Restriktionsenzyme deaktiviert. Die Separation und Reinigung der Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion (siehe 3.1.8).

3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Erfolgte die Ligation zur Verknüpfung zweier libPCR-Fragmente im Zuge der Bibliothekskonstruktion, wurden diese im äquimolaren Verhältnis mit 400-800 fmol eingesetzt. Wurde die Ligation zur Subklonierung eines Gens in einen Vektor durchgeführt, wurde das Insert in einem dreifachen, molaren Überschuss (180-600 fmol) zum Vektor (60-200 fmol) eingesetzt. Des Weiteren wurden 200-400 U T4 DNA Ligase und Reaktionspuffer (nach Herstellerangaben) hinzugefügt. Der Ansatz wurde 4-6 h bei 22 °C inkubiert, woraufhin die T4 DNA Ligase durch Inkubation bei 65 °C für 20 min deaktiviert wurde.

3.1.7 Megaprimer-Mutagenese

Zur Subklonierung der Gene, welche für die im Zuge des Phagen-Display angereicherten Trypsiligase-Varianten (siehe 3.4) codieren, in den *P. pastoris* Expressionsvektor pPICZαA wurde eine Megaprimer-Mutagenese nach Miyazaki & Takenouchi (2002) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der Megaprimer mittels PCR (siehe 3.1.3) hergestellt, wobei das Plasmid pMB04_LibRW_1.6_Out_Rd4 (siehe 2.3) und die Primer pPICZ_MW_fwd und pPICZ_MW_rev (siehe 2.2) verwendet wurden. Anschließend wurde der Megaprimer mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion (siehe 3.1.8) isoliert und gereinigt. Dieser wurde daraufhin in einer weiteren PCR anstatt eines Primerpaars mit einer Konzentration von 10 ng/µl eingesetzt, während hier das Plasmid pPICZαA_4Tn als Template

eingesetzt wurde. Nach erfolgter PCR wurde dem Ansatz 1 µl DpnI (siehe 2.6) hinzugefügt und 90 min bei 37 °C und weitere 20 min bei 80 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde im Anschluss direkt für eine Transformation von *E. coli* 5-alpha (siehe 2.4 und 3.2.1) eingesetzt.

3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA

Je nach Größe der zu separierenden DNA-Fragmente wurden 5,5 %ige Sieve GP (<100 bp; Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)) oder 1-2 %ige UltraPure (100-8000 bp; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)) Agarosegele nach Herstellerangaben angefertigt und mit 5-10 µl SYBR Safe Gel-Färbemittel versetzt. Die Proben wurden nach Herstellerangaben mit 6x Gel-Ladepuffer Orange (siehe 2.9) versetzt und in die Probentaschen überführt. Zudem wurden 10 µl eines geeigneten Referenzstandards (siehe 2.7; je nach Größe der DNA-Fragmente) in eine Probentasche überführt. Daraufhin erfolgte die Elektrophorese in TAE-Puffer (siehe 2.9) bei 80-100 V für 40-80 min. Die Detektion der DNA erfolgte anschließend mittels UV-Licht.

Die Präparation der separierten DNA-Fragmente erfolgte mittels Gelextraktion. Hierzu wurde der Bereich des Agarosegels, welcher die DNA gewollter Größe enthielt, mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Gelextraktion erfolgte unter Verwendung des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* (siehe 2.7) nach Herstellerangaben. Für die Elution der DNA wurden 20-50 µl steril filtriertes ddH₂O je Präparation verwendet.

3.1.9 Aufreinigung und Entsalzen von DNA-Lösungen

Die Aufreinigung von DNA erfolgte zum einen unter Verwendung des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* (siehe 2.7) nach Herstellerangaben. Davon abweichend wurden wiederrum 20-50 µl steril filtriertes ddH₂O für die Elution verwendet.

Für eine effiziente Elektroporation wurden Ligationsansätze mittels Ethanol-Fällung entsalzt. Diese wurden hierzu mit zwei Volumen eiskaltem, abs. Ethanol versetzt und bei -80 °C für 2 h inkubiert. Der Ansatz wurde 20 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet mit einem Volumen 70 %igen Ethanol gewaschen und wiederrum unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10 µl steril filtriertem ddH₂O resuspendiert.

3.1.10 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoPhotometer™ und einer Mikrolitermesszelle (LabelGuard™; siehe 2.11) mit virtueller Verdünnung von 1:10 bzw. 1:50 bestimmt. Hierzu wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen, um die Extinktion des Lösungsmittels (Wasser oder Puffer) korrigiert und die Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$E_{260} = \varepsilon_{dsDNA} \times c \times d \quad (1)$$

E_{260} = Extinktion bei 260 nm

ε_{dsDNA} = Extinktionskoeffizient dsDNA bei 260 nm (= 0,02 µl ng⁻¹ cm⁻¹)

c = Konzentration [ng µl⁻¹]

d = Schichtdicke [cm]

3.1.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von dem Dienstleister LGC Genomics GmbH (Berlin) durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte dementsprechend nach den Vorgaben des Dienstleisters.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* Zellen wurden ausschließlich käuflich erwerbbliche Zellsuspensionen verwendet, welche bereits als chemo- oder elektrokompetente Präparationen vorlagen (siehe 2.4). Die Transformation erfolgte jeweils nach Herstellerangaben. Für die Transformation von chemokompetenten Zellen wurden 50 ng Plasmid-DNA je Ansatz eingesetzt, während bei der Verwendung von elektrokompetenten Zellen 10-100 ng Plasmid-DNA je Ansatz eingesetzt wurden. Nach erfolgter Transformation wurden 100 µl oder der gesamte Ansatz auf entsprechendem Agar-Selektionsmedium ausgestrichen und 16 h bei 37 °C inkubiert.

3.2.2 Biosynthese rekombinanter Fab-Fragmente in *E. coli*

Die Herstellung der Her2-spezifischen Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cMyc und α Her2-Fab-TAALRH-cMyc erfolgte mittels Biosynthese in *E. coli* BL21(DE3). Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur aus 50 ml LB-Medium (siehe 2.5) mit 100 µg/ml Ampicillin mit einem *E. coli* BL21 (DE3) Klon, welcher zuvor mit den Expressionsplasmiden pASK_αHer2-TAAYRH-cMyc oder pASK_αHer2-TAALRH-cMyc transformiert wurde (siehe 3.2.1), angeimpft und 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden viermal 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in 3-l-Schikanekolben vorgelegt und mit jeweils 10 ml der Vorkultur inkuliert. Diese Hauptkulturen wurden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,8-1 erreicht war und daraufhin Anhydrotetracyclin mit einer finalen Konzentration von 0,2 µg/ml hinzugefügt wurde. Nach einer weiteren Inkubation für 4 h bei 30 °C unter Schütteln wurden die Zellsuspensionen bei 5000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *P. pastoris* X33

Sowohl die Herstellung als auch die Transformation elektrokompetenter *P. pastoris* X33 erfolgten nach dem gekürzten Protokoll nach Lin-Cereghino, Wong, & Giang, 2005. Abweichend davon wurden pro Transformation 200 ng linearisiertes Plasmid und 50 µl Zellsuspension eingesetzt. Die Linearisierung des Plasmids erfolgte zuvor mittels Restriktionsverdau (siehe 3.1.5) unter Verwendung des Restriktionsenzymes SacI HF. Unmittelbar nach der erfolgten Elektroporation wurden die Zellsuspensionen in 1 ml 50 % YPD-Medium, 0,5 M Sorbitol aufgenommen und für 1 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach erfolgter Transformation wurden 100 µl oder der gesamte Ansatz auf YPDS-Agar-Platten mit 100 µg/ml Zeocin (siehe 2.5) ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C inkubiert.

3.2.4 Biosynthese von Trypsiligase-Varianten in *P. pastoris* X33

Die Herstellung von Trypsiligase und Varianten dieser erfolgte mittels Biosynthese in *P. pastoris* X33 Zellen, welche zuvor mit dem entsprechenden pPICZ α A-Expressionsvektor transformiert wurden (siehe 3.2.3). Hierzu wurden zunächst 50 ml

BMD-Medium (siehe 2.5) in einem 300-ml-Schüttelkolben ohne Schikane vorgelegt und mit etwas Zellmaterial von einer YPDS-Agar-Platte angeimpft. Diese Vorkultur wurde 16 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation der Vorkultur bei 4000 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 ml BMM-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in einen 3-l-Schüttelkolben ohne Schikane überführt und bei 30 °C unter Schütteln und täglicher Zugabe von 3 ml Methanol inkubiert. Nach 120 h Inkubation wurden die Kulturen bei 5000 x g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mittels 0,45 µm Spritzenfilter steril filtriert. Der Überstand wurde bis zur Verwendung für die chromatografische Reinigung bei 4 °C gelagert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Chromatografische Reinigung der Fab-Fragmente

Für die chromatografische Reinigung der rekombinanten Fab-Fragmente wurde das Zellpellet der Biosynthese (siehe 3.2.2) zunächst in 20-30 ml Zellaufschlusspuffer (siehe 2.9) resuspendiert und bei 5000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 20-30 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert. Daraufhin erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall auf Eis bei zehnmal 30 s Puls, je 30 s Pause und 30 % Amplitude. Die unlöslichen Bestandteile wurden mittels Zentrifugation bei 100000 x g und 4 °C für 30 min abgetrennt und der Überstand mittels 0,45 µm Spritzenfilter steril filtriert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Fab-Fragmente aus dem Zelllysat mittels dem FPLC-System ÄKTAprime plus (siehe 2.11) und einer Affinitätschromatografie unter Verwendung einer HiTrap Protein G HP 1 ml Säule (siehe 2.10). Hierzu wurde das Zelllysat mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die zuvor mit Bindepuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und mit zehn Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Für die Elution wurden zunächst 50 µl Neutralisierungspuffer je Fraktion vorgelegt und die Fab-Fragmente daraufhin unter Verwendung des Elutionspuffers und einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 0,3 ml gesammelt und jene, welche eine erhöhte Absorption bei 280 nm zeigten, vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden anschließend einer Größenausschluss-Chromatografie unter Verwendung der ÄKTAprime plus und einer HiLoad 16/600 Superdex

75 pg Säule unterzogen. Hierzu wurde die Säule zunächst mit dem SEC-Laufpuffer äquilibriert und die Probe bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Trennung erfolgte wiederum bei einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und der Proteingehalt mittels Absorption bei 280 nm detektiert. Die Fraktionen, deren Retentionsvolumen einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa (ca. 60 ml) entsprach, wurden mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.4) analysiert und vereinigt, insofern eine Proteinspezies mit korrektem Molekulargewicht und Reinheit identifiziert werden konnte. Die vereinigten Fraktionen wurden unter Verwendung der Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra-4 10 kDa (siehe 2.11) nach Herstellerangaben auf ca. 200 µM konzentriert. Nach Bestimmung der Konzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie (siehe 3.3.3) wurde die Protein-Lösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Chromatografische Reinigung der Trypsilicase-Varianten

Die chromatografische Reinigung der Trypsilicase-Varianten erfolgte ebenfalls in zwei Schritten mittels einer Kationenaustausch- und einer anschließenden Größenausschluss-Chromatografie. Dafür wurde der Überstand der Biosynthese (siehe 3.2.4) zunächst mit 1/10 Volumen Bindepuffer für die Kationenaustausch-Chromatografie (siehe 2.9) versetzt. Die Isolierung der Trypsilicase-Varianten erfolgte mittels dem FPLC-System ÄKTAprime plus (siehe 2.11) unter Verwendung einer HiTrap SP FF 1 ml Säule (siehe 2.10). Hierzu wurde der verdünnte Überstand mit einer Flussrate von 4 ml/min auf die zuvor mit Bindepuffer äquilierte Säule aufgetragen und mit zehn Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Unter Verwendung des entsprechenden Elutionspuffers wurde das gebundene Protein anschließend eluiert und in 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Jene Fraktionen, welche eine erhöhte Absorption bei 280 nm zeigten, wurden vereinigt und unter Verwendung der Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra-4 10 kDa (siehe 2.11) nach Herstellerangaben auf ca. 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde anschließend einer Größenausschluss-Chromatografie unter Verwendung der ÄKTAprime plus und einer HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule unterzogen. Die Säule wurde zunächst mit dem SEC-Laufpuffer äquilibriert und die Probe bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Trennung erfolgte wiederum bei einer Flussrate von

1 ml/min. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und der Proteingehalt mittels Absorption bei 280 nm detektiert. Die Fraktionen, deren Retentionsvolumen einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa (ca. 75 ml) entsprach, wurden mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.4) analysiert und vereinigt, insofern eine Proteinspezies mit korrektem Molekulargewicht und Reinheit identifiziert werden konnte. Die vereinigten Fraktionen wurden unter Verwendung der Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra-4 10 kDa (siehe 2.11) nach Herstellerangaben auf ca. 50-100 µM konzentriert. Nach Bestimmung der Konzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie (siehe 3.3.3) wurde die Protein-Lösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Konzentrationen aller Protein-Lösungen wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie unter Verwendung des NanoPhotometer™ und einer Mikrolitermesszelle (LabelGuard™; siehe 2.11) mit einer virtuellen Verdünnung um Faktor 10 bestimmt. Es wurde die Extinktion in einem Wellenlängenbereich von 220 bis 400 nm gemessen und die Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Dabei wurden die Spektren jeweils um das UV/VIS-Spektrum des jeweiligen Puffers korrigiert. Der jeweilige Extinktionskoeffizient wurde anhand der Aminosäuresequenz mittels ProtParam (Gasteiger et al., 2005) aus dem ExPASy Portal (Artimo et al., 2012) berechnet.

$$E_{280} = \varepsilon_{280} \times c \times d \quad (2)$$

E_{280} = Extinktion bei 280 nm

ε_{280} = molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1} cm^{-1}$]

c = Konzentration [M]

d = Schichtdicke [cm]

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analytik hinsichtlich der Identifikation der Proteinspezies und der Reinheit von Protein-Lösungen erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970) unter Verwendung von 7,5 bzw. 15 % Acrylamid Sammel- bzw. Trenngelen, welchen nach Standardprotokollen angefertigt wurden (“SDS-PAGE Gel,” 2015). Zunächst

wurden 10-20 µl Protein-Lösung mit 30 % 3x SDS-Probenpuffer (siehe 2.9; für nicht reduzierende Bedingungen ohne 2-Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10-20 µl der Proben und 5-10 µl des Referenzstandards *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (siehe 2.7) auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte daraufhin bei 200 V für 40-50 min in Elektrophoresepuffer. Zur Detektion bzw. Visualisierung der Proteinbanden wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese einer Coomassie-Färbung nach Brunelle & Green (2014) oder alternativ einer Silberfärbung nach Nesterenko, Tilley, & Upton (1994) unterzogen.

3.3.5 LC/MS-Analytik von Proteinen

Die LC/MS-Analytik von Proteinlösungen diente zur Identifikation der korrekten Proteinspezies oder der Detektion von Transamidierungsprodukten in der enzymatischen Modifikation von Fab-Fragmenten. Hierzu wurden die zu analysierenden Proteinlösungen mit einer Konzentration von 5-10 µM in 150-200 ml/l Essigsäure vorgelegt. Von diesen Proben wurden 5-10 µl in ein ACQUITY UPLC-System (siehe 2.11) injiziert und anhand einer ACQUITY UPLC BEH C8 Säule (siehe 2.10) oder im Fall von Fab-Fragmenten einer MAbPac™ RP Säule mit einem linearen Acetonitril/Wasser-Gradienten von 5-80 % (BEH C8; mit 1 ml/l Ameisensäure) bzw. 10-50 % (MAbPac™) chromatografisch getrennt. Die Detektion der Proteine erfolgt dabei zum einen mittels PDA-Detektor im Wellenlängenbereich von 220-420 nm und zum anderen mittels Q-TOF Premier™ Massenspektrometer (siehe 2.11) unter Anwendung eines ESI-Q-TOF-MS-Verfahrens. Im Zuge der ESI-Q-TOF-MS wurden Ionen mit einem *m/z*-Verhältnis von 100-4000 Da detektiert. Die erhaltenen Spektren wurden anschließend unter Verwendung des MaxEnt-Algorithmus (maximale Entropie; Waters GmbH (Eschborn)) dekonvolutiert.

3.4 Selektion mittels M13-Phagen-Display

Die Anreicherung optimierter Varianten aus der randomisierten Bibliothek wurde anhand einer Selektion mittels Phagen-Display unter Verwendung des Bakteriophagen M13 realisiert. Dabei wurden insgesamt vier Selektionsrunden durchgeführt, welche sich im Wesentlichen in jeweils drei Einzelschritte unterteilen lassen. Diese Einzelschritte sind im Folgenden detailliert beschrieben.

3.4.1 Propagierung Trypsiligase-präsentierender Phagen

Die Propagierung von M13 Bakteriophagen, welche Trypsiligase-Varianten an ihrer Oberfläche präsentieren, stellte den ersten Schritt einer jeden Selektionsrunde dar. Hierzu wurde zunächst eine Kultur aus 20 ml 2xYT-Medium (siehe 2.5) mit 50 µg/ml Carbenicillin aus einem Glycerolstock von *E. coli* ER2738 Zellen (siehe 2.4), welche den pMB04-Phagemiden mit der randomisierten Bibliothek enthalten, angeimpft. Für die erste Runde der Selektion wurde hierbei *E. coli* ER2738 mit pMB04_LibRW_1.6 (siehe 2.3), also die vollständige Bibliothek, verwendet. Für die Folgerunden wurden jeweils *E. coli* ER2738 Zellen verwendet, welche im Zuge der Reinfektion (siehe 3.4.3) der vorhergehenden Runde erzeugt wurden, sodass diese jeweils eine bereits in vorhergehenden Runden selektierte Bibliothek enthielten (pMB04_LibRW_1.6_Out_Rd1-3). Diese Kulturen wurden in jedem Fall mit einer Start- OD_{600} von 0,05 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD_{600} von ca. 0,6 erreicht wurde. Daraufhin wurden der Kultur M13KO7 Helferphagen mit einer Multiplizität der Infektion von 2,5 hinzugefügt. Die Kultur wurde für 30 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln (60 rpm) und weitere 30 min bei 30 °C unter Schütteln (140 rpm) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 x g und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 ml 2xYT-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 0,02 µg/ml Anhydrotetracyclin resuspendiert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 25 °C unter Schütteln wurde Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml hinzugefügt und die Kultur für 15 h bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde bei 4000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und der Überstand mittels 0,45 µm Spritzenfilter filtriert. Dieser Phagen-Suspension wurden 10 ml PEG/NaCl-Lösung (siehe 2.9) hinzugefügt, bei 4 °C für 2 h inkubiert und bei 11400 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Phagen-Pellet in 20 ml Puffer T resuspendiert. Es wurden wiederrum 5 ml PEG/NaCl-Lösung hinzugefügt, bei 4 °C für 1 h inkubiert und bei 11400 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Phagen-Pellet in 4 ml Puffer T resuspendiert. Diese Phagen-Suspension wurde erneut bei 16000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und der Überstand mit 4 ml 800 ml/l Glycerol versetzt. Die Lösungen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrosten und bis zur

weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für eine Phagentiter-Bestimmung wurden von den so angefertigten Phagen-Lösungen jeweils 10 µl abgenommen und unter Verwendung von 2xYT-Medium eine Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 10^1 - 10^{10} angefertigt. Von den 10^8 - 10^{10} -Verdünnungen wurden jeweils 90 µl mit 810 µl logarithmisch wachsenden *E. coli* ER2738 Zellen versetzt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Jeweils 90 µl dieser Zellsuspensionen wurden auf 2xYT-Agarplatten mit 50 µg/ml Carbenicillin ausgestrichen und 16 h bei 30 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Kolonienanzahl bestimmt und unter Einberechnung des Verdünnungsfaktors der Phagentiter in cfu/ml berechnet.

3.4.2 Selektion und Anreicherung optimierter Varianten

Der Selektionsschritt einer jeden Phagen-Display-Runde diente zur Anreicherung optimierter Varianten aus dem zuvor generierten Phagen-Pool (siehe 3.4.1). Um den Selektionsdruck von Runde zu Runde zu erhöhen, wurden verschiedene Parameter zwischen den einzelnen Runden variiert. Hierzu zählte das Volumen der eingesetzten, magnetischen Beads, die Anzahl der durchgeführten Waschschrifte, die Konzentration des peptidischen Nukleophils während der Elution sowie die Inkubationszeit während der Elution. Zudem variierte die Menge der eingesetzten Phagen von Runde zu Runde. In Tabelle 14 sind die während der einzelnen Selektionsrunden zur Anwendung gekommenen Parameter zusammengefasst.

Tabelle 14: Übersicht der angewendeten Parameter der einzelnen Selektionsrunden

Selektionsrunde	1	2	3	4
V (M-270 Beads) [µl]	100	50	50	25
Eingesetzte Phagen [cfu]	$2 \cdot 10^{11}$	$8,8 \cdot 10^{11}$	$2,8 \cdot 10^{10}$	$6,5 \cdot 10^{10}$
Anzahl Waschschrifte Puffer TT0,1	3	5	7	9
Anzahl Waschschrifte Puffer T	2	3	3	3
c (Nukleophil-Peptid) [µM]	100	50	10	2
Inkubationszeit Elution [min]	30	20	15	10

Die Durchführung einer Selektionsrunde ist im Folgenden beschrieben. Zunächst wurden 25-100 µl der Dynabeads™ M-270 Streptavidin (siehe 2.10) dreimal mit je

500 µl Puffer T (siehe 2.9) gewaschen, mit 500 µl 10x *Casein Blocking Buffer* versetzt und 16 h bei 4 °C in einem Rotator inkubiert. Am Folgetag wurden die geblockten M-270 Beads erneut dreimal mit je 500 µl Puffer T gewaschen, mit 200 µl 20 µM Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH (siehe 2.8) in Puffer T versetzt und für 90 min bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Es folgte ein erneutes Waschen mit dreimal 500 µl Puffer T, woraufhin 200 µl Phagen-Lösung (cfu siehe Tabelle 14) mit 100 µM ZnCl₂ in Puffer T zu den Beads gegeben wurden. Nach Inkubation für 60 min bei 30 °C unter Schütteln wurden zunächst 3-9 Waschschrifte (siehe Tabelle 14) mit jeweils 500 µl Puffer TT0,1 und anschließend 2-3 Waschschrifte mit jeweils 500 µl Puffer T durchgeführt. Anschließend erfolgte die Elution gebundener Phagen durch Zugabe von 500 µl 2-100 µM H-RHAAGEQKLISEEDL-OH mit 100 µM ZnCl₂ in Puffer T und Inkubation bei 30 °C für 10-30 min unter Schütteln. Dieses Eluat wurde abgenommen und für eine anschließende Reinfektion von *E. coli* ER2738 sowie eine Phagentiter-Bestimmung eingesetzt (siehe 3.4.3).

3.4.3 Reinfektion von *E. coli* ER2738 und Phagentiter-Bestimmung

Durch die Reinfektion von *E. coli* ER2738 Zellen mit dem während der Selektion generierten Phagenpool (siehe 3.4.2) konnte die genetische Information der angereicherten Varianten wiedergewonnen und vervielfältigt werden. Hierzu wurde das Eluat der Selektion mit 1 ml logarithmisch wachsenden *E. coli* ER2738 Zellen versetzt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Die gesamte Zellsuspension wurde anschließend auf 2xYT-Agarplatten (siehe 2.5) mit 100 µg/ml Carbenicillin ausgestrichen und 16 h bei 30 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die entstandenen Kolonien mit 2-4 ml 2xYT-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin pro Platte abgeschwemmt. Die Zellsuspension wurde zu je 750 µl aliquotiert und jeweils mit 250 µl 800 ml/l Glycerol versetzt. Diese Glycerolstocks wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrosten und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für eine Phagentiter-Bestimmung wurden je Selektionsrunde von den Waschfraktionen 5; 8; 10 und 12 sowie von dem Eluat jeweils 10-20 µl Probe abgenommen. Zudem wurde von dem Eluat eine 10- und 100-fach Verdünnung in Puffer T angefertigt. Jeweils 10 µl dieser Proben und Verdünnungen wurden mit 990 µl logarithmisch wachsenden *E. coli* ER2738 Zellen versetzt und bei 30 °C für 30 min

inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl dieser Zellsuspensionen auf 2xYT-Agarplatten mit 50 µg/ml Carbenicillin ausgestrichen und 16 h bei 30 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Kolonienanzahl bestimmt und unter Einberechnung des Verdünnungsfaktors der Phagentiter in cfu/ml berechnet.

3.5 ELISA-basiertes Screening im Hochdurchsatz-Format

Zur Identifikation optimierter Varianten aus dem Pool der angereicherten Varianten nach vier Selektionsrunden mittels Phagen-Display wurde ein ELISA-basiertes Screening im Hochdurchsatz-Format durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Biosynthese von Trypsiligase im MTP-Format validiert und die enzymatische Aktivität mittels ELISA nachgewiesen. Daraufhin mussten die Einzelvarianten zunächst im MTP-Format in *P. pastoris* X33 hergestellt werden, um diese anschließend für das Screening einsetzen zu können.

3.5.1 Biosynthese von Trypsiligase im MTP-Format

Zur Validierung der rekombinanten Herstellung von Trypsiligase im MTP-Format wurden zunächst 96 Kolonien einer Agarplatte mit *P. pastoris* X33 Zellen, welche zuvor mit dem Expressionsvektor pPICZαA_4Tn (siehe 2.3) transformiert wurden (siehe 3.2.3), unter Verwendung des QPix 2 Kolonienpickers (siehe 2.11) gepickt und auf eine MTP (Microplatte 96-well PP V-Boden; siehe 2.10) überführt, in welcher zuvor 150 µl YPD-Medium (siehe 2.5) je Kavität vorgelegt wurden. Nach Inkubation der MTP für 24 h bei 30 °C unter Schütteln wurden 50 µl 800 ml/l Glycerol je Kavität hinzugefügt und nochmals für 30 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nun wurde eine 96 Deep-Well Platte (siehe 2.10) mit 400 µl BMD-Medium (siehe 2.5) je Kavität vorgelegt und unter Verwendung des QPix 2 Kolonienpickers aus der zuvor generierten Glycerolstock-MTP angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 30 °C unter Schütteln für 48 h inkubiert. Daraufhin erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 400 µl BMM-Medium mit 60 ml/l Methanol je Kavität und einer Inkubation für 72 h bei 30 °C unter Schütteln.

Nach der erfolgten Biosynthese wurden Kulturen bei 4000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Nun wurden 200 µl der Überstände ausgewählter Kavitäten abgenommen und in Microcon-10 kDa Zentrifugen-Filtereinheiten (siehe 2.10) überführt. Diese wurden bei 14000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert um anschließend

400 µl 100 mM HEPES; 100 mM NaCl pH 7,8 je Filtereinheit hinzuzufügen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und nach der letzten Zentrifugation 200 µl Puffer T (siehe 2.9) je Filtereinheit hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln konnten die umgepufferten Überstände für den nachfolgenden Aktivitätsnachweis mittels ELISA eingesetzt werden.

3.5.2 Aktivitätsnachweis für Trypsiligase mittels ELISA

Mittels ELISA sollte nun die enzymatische Aktivität der im MTP-Format hergestellten Trypsiligase nachgewiesen werden. Hierzu wurden die im vorherigen Schritt generierten Überstände vereinigt und für Transamidierungsreaktionen eingesetzt. Dabei wurden 2- und 4-fach Verdünnungen der Überstände in Puffer T (siehe 2.9) angefertigt und mit gleichen Volumina 50 µM Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH; 100 µM H-RHAAGEQKLISEEDL-OH; 200 µM ZnCl₂ in Puffer T versetzt. Als Positivkontrolle wurde eine Lösung von 1 µM Trypsiligase in Puffer T ebenfalls mit einem gleichen Volumen der Substrat-Nukleophil-Mischung versetzt. Diese Reaktionsansätze wurden nun bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0; 2,5; 7,5; 10; 20; 30; 60; 120 min) wurden 40 µl der Reaktionsansätze abgenommen und 60 µl Stopp-Puffer (siehe 2.9) hinzugefügt. Diese abgestoppten Reaktionslösungen wurden nun auf einzelne Kavitäten von Pierce™ Streptavidin-beschichteten 8-well Streifen (siehe 2.10) überführt und für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit dreimal 200 µl TBST0,05-Puffer (siehe 2.9), woraufhin 100 µl α-c-Myc-Antikörper (siehe 2.6) 1:2500 in TBST0,05-Puffer je Kavität hinzugefügt wurden. Nach erneuter Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde der Waschschritt wiederholt und 100 µl α-Maus-IgG-HRP-Antikörper (siehe 2.6) 1:4000 in TBST0,05-Puffer je Kavität hinzugefügt. Es wurde wiederrum für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und der Waschschritt wiederholt. Nun wurden 50 µl TMB ONE Substrat (siehe 2.7) je Kavität hinzugefügt, für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 0,2 M H₂SO₄ abgestoppt. Unter Verwendung des SpectraMax® Paradigm® MTP-Reader (siehe 2.11) wurde die Absorption bei 450 nm jeder Kavität gemessen und durch Subtraktion der Hintergrund-Absorption bei 620 nm korrigiert.

3.5.3 Biosynthese von Einzelvarianten im MTP-Format

Für die Biosynthese der mittels Phagen-Display angereicherten Varianten (siehe 3.4) in *P. pastoris* X33 mussten die entsprechenden Gene zunächst in den Expressionsvektor pPICZ α A (siehe 2.3) subkloniert werden. Hierzu wurde als erster Schritt eine Kultur aus 20 ml 2xYT-Medium (siehe 2.5) mit 50 μ g/ml Carbenicillin unter Verwendung des Glycerolstocks *E. coli* ER2738 mit pMB04_LibRW_1.6_Out_Rd4 (siehe 2.3 und 3.4.3) mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und für 4 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Kultur wurde daraufhin für die Isolierung des Plasmids pMB04_LibRW_1.6_Out_Rd4 eingesetzt (siehe 3.1.1). Dieses Plasmid wurde im Anschluss für eine Megaprimer-Mutagenese, wie unter 3.1.7 beschrieben, eingesetzt, wodurch der Expressionsvektor pPICZ α A_LibRW_1.6_Out_Rd4 generiert wurde. Dieser wurde für eine Transformation in *E. coli* 5-alpha eingesetzt (siehe 3.2.1), wobei insgesamt vier Ansätze präpariert und vollständig auf LBLS-Agarplatten mit 25 μ g/ml Zeocin ausgestrichen wurden. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 16 h wurden die Agarplatten mit insgesamt 6 ml LBLS-Medium mit 25 μ g/ml Zeocin abgeschwemmt und die Zellsuspensionen für eine Isolierung des Plasmids eingesetzt (siehe 3.1.1). Das so präparierte Plasmid pPICZ α A_LibRW_1.6_Out_Rd4 wurde nun für eine Transformation von elektrokompetenten *P. pastoris* X33 Zellen verwendet (siehe 3.2.3), wobei insgesamt sechs Transformationen durchgeführt wurden, welche vollständig auf YPDS-Agarplatten mit 100 μ g/ml Zeocin ausgestrichen wurden.

Diese Agarplatten mit Einzelklonen aus *P. pastoris* X33 Zellen mit pPICZ α A_LibRW_1.6_Out_Rd4 wurden nun für ein *picking* unter Verwendung des QPix 2 Kolonienpickers (siehe 2.11) eingesetzt, um Glycerolstocks von Einzelklonen im MTP-Format generieren zu können. Hierzu wurden vier MTP (Microplatte 96-well PP V-Boden; siehe 2.10) mit 150 μ l YPD-Medium je Kavität vorgelegt und mit insgesamt 368 Kolonien von den Agarplatten unter Verwendung des Kolonienpickers angeimpft. Die Kavitäten D7, D8, E7 und E8 einer jeden MTP wurden dabei nicht verwendet, sondern von Hand mit *P. pastoris* X33 Wildtyp (D7/D8) bzw. *P. pastoris* X33 mit pPICZ α A_4Tn (E7/E8) angeimpft. Nach Inkubation der MTP für 24 h bei 30 °C unter Schütteln wurden 50 μ l 800 ml/l Glycerol je Kavität hinzugefügt und nochmals für 30 min bei 30 °C unter Schütteln

inkubiert. Die so generierten Glycerolstocks von Einzelklonen im MTP-Format wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrosten und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Proteinbiosynthese der Einzelvarianten erfolgte nun unter Verwendung der Glycerolstocks im MTP-Format. Hierzu wurden die Glycerolstock-MTP zunächst bei 30 °C für 30 min unter Schütteln inkubiert. Es wurden vier 96 Deep-Well Platten (siehe 2.10) mit 400 µl BMD-Medium (siehe 2.5) je Kavität vorgelegt und unter Verwendung des QPix 2 Kolonienpickers aus den Glycerolstock-MTP angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 30 °C unter Schütteln für 48 h inkubiert. Daraufhin erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 400 µl BMM-Medium mit 60 ml/l Methanol je Kavität und einer Inkubation für 72 h bei 30 °C unter Schütteln. Anschließend wurden die Kulturen bei 4000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, 200 µl der Überstände je Kavität abgenommen und auf vier MultiScreen® Filterplatten mit Ultracel®-10 Membran (siehe 2.10) überführt. Diese Filterplatten wurden nun bei 3000 x g und 4 °C für 90 min zentrifugiert, 300 µl 100 mM HEPES; 100 mM NaCl pH 7,8 je Kavität hinzugefügt und für 5 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, die Filterplatten ein letztes Mal bei 3000 x g und 4 °C für 90 min zentrifugiert und 200 µl Puffer T (siehe 2.9) je Kavität hinzugefügt. Nach einer erneuteten Inkubation für 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur konnten die so umgepufferten Enzymlösungen nun für das ELISA-basierte Screening (siehe 3.5.2) eingesetzt werden.

3.5.4 ELISA-basiertes Screening

Für das ELISA-basierte Screening wurden zunächst die Transamidierungsreaktionen angesetzt, indem je MTP 85 µl der umgepufferten Enzymlösungen, welche im Zuge der Biosynthese (siehe 3.5.1) generiert wurden, auf eine neue MTP (Microplatte 96-well PP V-Boden; siehe 2.10) überführt und je Kavität 85 µl 50 µM Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH; 100 µM H-RHAAGEQKLISEEDL-OH; 200 µM ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9) hinzugefügt wurden. Diese Reaktionsansätze wurden nun bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 5; 30; 60 und 150 min wurden je Kavität 35 µl der Reaktionsansätze abgenommen und auf eine neue Stopp-MTP

(Microplatte 96-well PP V-Boden) je Zeitpunkt überführt, in denen zuvor 50 µl Stopp-Puffer (siehe 2.9) je Kavität vorgelegt wurden. Diese vier Stopp-MTP je Screening-Platte wurden nun auf einer Pierce™ Streptavidin-beschichteten 384-well Platte (siehe 2.10) konsolidiert, indem 25 µl je Kavität der Stopp-MTP auf diese überführt wurden. Nach einer Inkubation dieser 384-well MTP für 60 min bei 22 °C unter Schütteln erfolgte ein Waschschnitt mit dreimal 100 µl TBST0,05-Puffer (siehe 2.9) je Kavität. Daraufhin wurden 25 µl α-c-Myc-Antikörper (siehe 2.6) 1:3000 in TBST0,05-Puffer je Kavität hinzugefügt und erneut für 60 min bei 22 °C unter Schütteln inkubiert. Es wurde wiederrum mit dreimal 100 µl TBST0,05-Puffer je Kavität gewaschen, 25 µl α-Maus-IgG-HRP-Antikörper (siehe 2.6) 1:5000 in TBST0,05-Puffer je Kavität hinzugefügt und für 60 min bei 22 °C unter Schütteln inkubiert. Nun wurde mit dreimal 100 µl TBST0,05-Puffer und dreimal 100 µl TBS-Puffer je Kavität gewaschen und 25 µl TMB ONE Substrat (siehe 2.7) je Kavität hinzugefügt. Die 384-well Platten wurden für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 0,2 M H₂SO₄ je Kavität abgestoppt. Unter Verwendung des SpectraMax® Paradigm® MTP-Reader (siehe 2.11) wurde die Absorption bei 450 nm jeder Kavität gemessen und durch Subtraktion der Hintergrund-Absorption bei 620 nm korrigiert. Zudem wurden alle Messwerte durch Subtraktion der korrigierten und gemittelten Werte der Negativkontrollen (Kavitäten D7/D8; *P. pastoris* X33 Wildtyp) je MTP normiert.

3.6 Charakterisierung optimierter Trypsiligase-Varianten

3.6.1 Transamidierungsstudien

Im Zuge der Transamidierungsstudien wurden Produkt-Zeit-Verläufe unter Variation der eingesetzten Trypsiligase-Variante, der Enzym-Konzentration, der Substrat-Konzentration, der Nukleophil-Konzentration, der eingesetzten Substrat- bzw. Nukleophil-Peptide und der Reaktionszeit aufgenommen. Hierzu wurde zunächst eine Substrat/Nukleophil/Zink-Reaktionslösung mit zweifachen Endkonzentrationen der Bestandteile in Puffer T (siehe 2.9) sowie eine Enzym-Lösung mit zweifacher Endkonzentration in Puffer T angefertigt und beide Lösungen bei 30 °C für 5 min vorinkubiert. Die Transamidierungsreaktion wurde durch Mischung

gleicher Volumina beider Lösungen gestartet und die Reaktionsansätze bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Endkonzentrationen der Reaktionsbestandteile liegen bei 15-250 µM Substrat-Peptid (siehe 2.8), 30-5000 µM Nukleophil-Peptid, 100 µM ZnCl₂ und 1-20 µM Enzym. Zu definierten Zeitpunkten wurden 10-50 µl der Reaktionsansätze abgenommen und zum Abstoppen der Reaktion in verdünnte oder reine Essigsäure überführt, wobei die Endkonzentration der Essigsäure bei 150-200 ml/l lag. Die so generierten Proben wurden anschließend unter Verwendung des ACQUITY UPLC-Systems (siehe 2.11) mit einer ACQUITY UPLC *Peptide* BEH C18 Säule und Vorsäule (siehe 2.10) analysiert. Hierbei wurde ein linearer Acetonitril/Wasser-Gradient (mit 0,5 ml/l TFA) verwendet. Die Detektion von Substrat, Aminolyse- und Hydrolyseprodukt erfolgte photometrisch bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm (Absorptions-maximum der Benzoylgruppe). Die Peakflächen der drei Peptidspezies wurden unter Verwendung der Software MassLynx (Version 4.1, Waters GmbH (Eschborn)) bestimmt und ins Verhältnis gesetzt, um die prozentualen Anteile jeder Spezies zu berechnen. Anhand der prozentualen Anteile und der eingesetzten Substratkonzentration konnten so auch die Konzentrationen an Substrat, Aminolyse- und Hydrolyseprodukt der jeweiligen Zeitpunkte berechnet werden.

3.6.2 Hydrolysestudien

Für die optimierten Trypsiligase-Varianten 1C11 und 4F8 wurden Hydrolysestudien unter Verwendung verschiedener Substrat-Peptide mit *N*-terminaler Benzoylgruppe (siehe 2.8) durchgeführt. Die Durchführung dieser Hydrolysestudien war dabei mit der Durchführung, welche bereits zu den Transamidierungsstudien unter 3.6.1 beschrieben wurde, weitestgehend identisch. Abweichend davon wurden die Substrat-Peptide mit einer Endkonzentration von 1 mM und die Varianten 1C11 und 4F8 mit einer Endkonzentration von 2-4 µM eingesetzt. Von den Reaktionsansätzen wurden nach jeweils 1; 2; 4 und 8 min Inkubation 20 µl abgenommen und in 40 µl 250 ml/l Essigsäure überführt. Die weitere Analytik dieser Proben glich derer, welche bereits im Rahmen der Transamidierungsstudien unter 3.6.1 beschrieben wurde, wobei hier die prozentualen Anteile und Konzentrationen an Substrat und Hydrolyseprodukt bestimmt wurden. Die gemessenen

Konzentrationen an Hydrolyseprodukt wurden jeweils gegen die Reaktionszeit aufgetragen und mittels linearer Regression die Reaktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{M}/\text{s}$ bestimmt. Durch Division der Reaktionsgeschwindigkeit mit der eingesetzten Enzymkonzentration wurden zudem die apparenten Wechselzahlen berechnet.

3.6.3 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat}

Die enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} wurden für die Trypsilicase mit dem Substrat-Peptid Bz-AAYRHAAG-OH (siehe 2.8) und für Variante 1C11 mit den Substrat-Peptiden Bz-AAYRHAAG-OH und Bz-AALRHAAG-OH bestimmt. Hierzu wurden Transamidierungsreaktionen wie unter 3.6.1 beschrieben angesetzt, wobei die Konzentrationen der Substrat-Peptide zwischen 10-25.000 μM variiert wurden. Die Konzentration des Nukleophil-Peptides wurde mit 10 mM jeweils konstant gehalten, was auch auf die jeweilige Enzymkonzentration zutraf ($c(\text{Trypsilicase}) = 0,3 \mu\text{M}; c(1\text{C}11) = 0,1 \text{ bzw. } 1 \mu\text{M}$). Daneben wurden die Parameter zusätzlich für Variante 1C11 bei konstanter Konzentration des Substrat-Peptids Bz-AALRHAAG-OH (6 mM) und variierender Konzentration des Nukleophil-Peptides H-RHAK-OH von 20-6000 μM bestimmt. Zu definierten Zeitpunkten wurden wiederum 5-20 μl Probe der Reaktionsansätze abgenommen und, wie unter 3.6.1 beschrieben, abgestoppt und analysiert. Dabei wurden die Zeitpunkte so gewählt, dass der Produktumsatz jeweils unter 10 % lag. Die gemessenen Konzentrationen an Aminolyseprodukt wurden jeweils gegen die Reaktionszeit aufgetragen und mittels linearer Regression die Reaktionsgeschwindigkeit in nM/s bestimmt.

3.6.4 Studien zur Zinkionen-Abhängigkeit

Für Variante 1C11 in Kombination mit dem Substrat-Peptid Bz-AALRHAAG-OH (siehe 2.8) wurde der Einfluss der Zn^{2+} -Ionen-Konzentration auf die Transamidierungskinetik untersucht. Hierzu wurden wiederum Transamidierungsreaktionen, wie unter 3.6.1 beschrieben, angesetzt, wobei nun die Zinkchlorid-Konzentration zwischen 0-800 μM variiert wurde. Die Konzentrationen der weiteren Reaktionsbestandteile wurden dagegen konstant gehalten (0,5 μM 1C11; 600 μM Bz-AALRHAAG-OH; 1200 μM H-RHAK-OH in Puffer T). Nach 2,5; 5; 7,5 und 10 min wurden jeweils 10 μl Probe abgenommen und in 50 μl 200 ml/l Essigsäure überführt.

Diese Proben wurden, wie bereits beschrieben (siehe 3.6.1), mittels UPLC analysiert. Die so bestimmten Aminolyseprodukt-Konzentrationen wurden gegen die Reaktionszeit aufgetragen und mittels linearer Regression die Reaktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{M}/\text{s}$ berechnet. Durch Division der Reaktionsgeschwindigkeiten mit der Enzymkonzentration ($0,5 \mu\text{M}$) wurden zudem die apparenten k_{cat} -Werte in s^{-1} berechnet.

3.6.5 Studien zur pH-Abhängigkeit

Die Abhängigkeit der Transamidierungskinetik vom pH-Wert wurde ebenfalls für die Variante 1C11 mit dem Substrat-Peptid Bz-AALRHAAG-OH (siehe 2.8) untersucht. Im Zuge dessen wurden, wie unter 3.6.1 beschrieben, Transamidierungsreaktionen angesetzt, wobei der pH-Wert des Puffers T (siehe 2.9) im Pufferbereich von HEPES zwischen 6,6-8,4 variiert wurde. Die weiteren Bestandteile wurden in den Konzentrationen $0,5\text{-}2 \mu\text{M}$ 1C11; $600 \mu\text{M}$ Bz-AALRHAAG-OH; $1200 \mu\text{M}$ H-RHAK-OH; $100 \mu\text{M}$ ZnCl_2 eingesetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ Probe abgenommen und in $50 \mu\text{l}$ 200 ml/l Essigsäure abgestoppt. Diese Proben wurden wiederum mittels UPLC (siehe 3.6.1) analysiert. Wie unter 3.6.4 geschildert, wurden die apparenten k_{cat} -Werte für die Aminolyse und zusätzlich für die Hydrolyse aus den gemessenen Daten berechnet. Zudem wurde jeweils die maximale Ausbeute an Aminolyseprodukt in % bestimmt.

3.7 C-terminale Modifikation des α Her2-Fab-Fragments

Die Durchführung zur Modifikation von α Her2-Fab-Fragmenten glich im Wesentlichen jener, welche bereits im Zuge der Transamidierungsstudien (siehe 3.6.1) zur Anwendung kam. Im Gegensatz dazu, wurden hier die Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc und α Her2-Fab-TAALRH-cmyc (siehe 2.6) anstelle der Substrat-Peptide eingesetzt. Als Nukleophil-Peptide wurden das (5)6-Carboxyfluorescein (FAM) tragende Peptid H-RHAK(FAM)-OH und das Toxin DM1 tragende Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH (siehe 2.8) verwendet. Die Reaktionsansätze mit den Endkonzentrationen $100 \mu\text{M}$ Fab-Fragment; $500 \mu\text{M}$ H-RHAK(FAM)-OH/H-RHAK(MCC-DM1)-OH; $100 \mu\text{M}$ ZnCl_2 und $10 \mu\text{M}$ Trypsiligrase oder Variante 1C11 wurden bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils $2 \mu\text{l}$ der Reaktionsansätze abgenommen und in $20 \mu\text{l}$ 250 ml/l

Essigsäure überführt. Die gewonnenen Proben der Reaktionsansätze mit dem Nukleophil-Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH wurden anschließend unter Verwendung des ACQUITY UPLC-Systems (siehe 2.11) mit einer MAbPac™ RP Säule (siehe 2.10) analysiert. Die chromatografische Auftrennung von Edukt und Aminolyseprodukt erfolgte dabei anhand eines linearen Acetonitril/Wasser-Gradiennten (mit 0,5 ml/l TFA) von 35-45 %, während die Detektion bei 280 nm erfolgte. Die Peakflächen wurden mittels Integration unter Verwendung der Software MassLynx (Version 4.1, Waters GmbH (Eschborn)) berechnet und ins Verhältnis gesetzt. Dabei wurden die Peakflächen entsprechend der Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Fab-Spezies korrigiert (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Fab-Spezies und des Nukleophils

Fab-Spezies/Nukleophil	$\varepsilon [M^{-1} cm^{-1}]$
α Her2-Fab-TAAYRH-cmcy	73270
α Her2-Fab-TAALRH-cmcy	71780
α Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1)-OH	77970
α Her2-Fab-TAALRHAK(MCC-DM1)-OH	76480
α Her2-Fab-TAAY-OH	73270
α Her2-Fab-TAAL-OH	71780
H-RHAK(MCC-DM1)-OH	4700

Sowohl die Proben von verschiedenen Zeitpunkten der Reaktionsansätze mit dem Nukleophil-Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH als auch mit dem Nukleophil-Peptid H-RHAK(FAM)-OH wurden zudem mittels LC/MS-Analytik (siehe 3.3.5) untersucht.

3.8 Funktionsanalyse der modifizierten Fab-Fragmente mittels ELISA

Um die Bindungsfunktionalität der modifizierten Fab-Fragmente zu überprüfen, wurden zunächst Reaktionsansätze mit dem Nukleophil-Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH, wie unter 3.7 beschrieben, angesetzt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert, woraufhin 10 µl der Reaktion in 990 µl 10-fach in PBS verdünnten Blockierungspuffer (siehe 2.9) überführt wurden. Aus

dieser 1:100-Verdünnung wurde anschließend eine Verdünnungsreihe von 10-0,005 nM in 10-fach verdünnten Blockierungspuffer angefertigt. Analog dazu wurden auch identische Verdünnungsreihen der unmodifizierten Fab-Fragmente als Kontrollen angefertigt.

Für den konzentrationsabhängigen ELISA wurden Nunc MediSorp™ 96-well Platten (siehe 2.10) zunächst mit 50 ng pro Kavität (50 µl; 1 ng/µl) der humanen Ektodomäne des Her2-Rezeptors (siehe 2.6) beschichtet. Nach der Inkubation für 16 h bei 4 °C wurden die MTP dreimal mit 300 µl PBST0,05 (siehe 2.9) pro Kavität gewaschen und durch Zugabe von 200 µl Blockierungspuffer je Kavität und Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln blockiert. Die MTP wurden erneut dreimal mit 300 µl PBST0,05 je Kavität gewaschen und 75 µl der Verdünnungsreihen der modifizierten und unmodifizierten Fab-Fragmente pro Kavität zugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln wurden die MTP erneut gewaschen (3x 300 µl PBST0,05) und 75 µl einer 1:3000-Verdünnung des α -Human-IgG (Fab-spezifisch)-HRP-Antikörpers pro Kavität zugegeben. Es wurde erneut 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und dreimal mit 300 µl PBST0,05 und dreimal mit 300 µl PBS je Kavität gewaschen. 50 µl TMB ONE-Substrat (siehe 2.7) wurden pro Kavität zugegeben, 5 min im Dunkeln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,2 M H₂SO₄ pro Kavität gestoppt. Mittels Sunrise™ Plattenleser (siehe 2.11) wurde die Absorption jeder Kavität bei 450 nm gemessen und um die Hintergrundabsorption bei 600 nm korrigiert.

3.9 Statistik und Fehlerangaben

Sämtliche in dieser Arbeit enthaltenen Messergebnisse zur enzymkinetischen Charakterisierung der Trypsiligase-Varianten (Kapitel 4.4, 4.5 und 4.6) sind Mittelwerte, welche aus unabhängigen 3-fach-Bestimmungen resultieren. Zu jedem Mittelwert wurde jeweils die Standardabweichung bestimmt. Insbesondere im Falle der apparenten k_{cat} -Werte wurde zum Zwecke der Übersichtlichkeit auf die Wiedergabe der Standardabweichung verzichtet, welche jeweils kleiner als 10 % ist. Die Fehler der Quotienten von k_{cat}/K_M wurden durch Addition der relativen Fehler von k_{cat} und K_M ermittelt, wobei aus der Summe wiederum der absolute Fehler berechnet wurde.

4 Ergebnisse

Das primäre Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Optimierung der Trypsinvariante K60E, N143H, E151H, D189K hinsichtlich ihres Synthesepotentials. Diese Trypsinvariante – auch Trypsiligase genannt – wurde anhand eines rationalen Enzymdesigns im Rahmen der Promotionsarbeit von Frau Dr. Sandra Liebscher (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Liebscher, 2008)) entwickelt und charakterisiert. Die Optimierung dieses Biokatalysators sollte anhand eines semi-rationalen Enzym-Designs realisiert werden, welche im Wesentlichen aus der Generierung einer randomisierten Gen-Bibliothek, der Selektion mittels Phagen-Display und einem ELISA-basierten Hochdurchsatzscreening bestand. So wurde zunächst eine randomisierte Bibliothek auf Grundlage des Gens der Trypsiligase hergestellt, welche anschließend für ein Phagen-Display verwendet wurde, um optimierte Varianten anzureichern. Aus diesem Pool der angereicherten Varianten wurden daraufhin in einem ELISA-basierten Screening die Varianten identifiziert, welche verbesserte Syntheseeigenschaften zeigten. Anhand einer primären Charakterisierung wurden wiederum die vielversprechendsten Varianten ermittelt, welche z.B. hinsichtlich Spezifität oder Syntheseeffizienz detaillierter analysiert wurden. Zudem wurde die Anwendbarkeit dieser Varianten für die angestrebte Modifizierung von Proteinen validiert, was unter Verwendung eines Fab-Fragmentes als praxisorientiertes Modellsystem untersucht wurde.

4.1 Generierung der randomisierten DNA-Bibliothek

Die Konzeption und Herstellung einer DNA-Bibliothek auf Basis der Trypsiligase stellte den ersten Schritt im Zuge des semi-rationalen Enzym-Designs dieses Biokatalysators dar. Hierzu wurde zunächst ein Bibliotheksdesign entworfen und dieses im Anschluss in der Herstellung umgesetzt. Zudem erfolgte eine eingehende Qualitätskontrolle der Bibliothek hinsichtlich Funktionalität und Diversität.

4.1.1 Bibliotheksdesign basierend auf Trypsiligase

Um eine Optimierung der Trypsiligase als Biokatalysator für die Transamidierung zu erreichen, stellte das Bibliotheksdesign einen erfolgskritischen Faktor dar. Insbesondere die Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurepositionen war hier

von essentieller Bedeutung. Da das Verhältnis von Aminolyse- zu Hydrolyseaktivität einen wesentlichen Einfluss auf die erreichbare Produktausbeute hat, war es dementsprechend das Ziel, dieses Verhältnis zugunsten der Aminolyseaktivität zu verbessern. So sollten also Aminosäurepositionen ausgewählt werden, welche dieses Verhältnis beeinflussen können, wobei dieser Arbeit drei theoretische Ansätze zugrunde lagen:

- 1) Verringerung der Hydrolyseaktivität durch Mutation von Aminosäurepositionen, welche in der Literatur in Zusammenhang mit der Hydrolyseaktivität von Trypsin beschrieben sind, aber nicht zur katalytischen Triade zählen;
- 2) Erzeugung eines hydrophoben Clusters innerhalb des aktiven Zentrums, um die Affinität für Wassermoleküle als konkurrierende Nukleophile zu verringern;
- 3) Steigerung der Aminolyse- oder Verringerung der Hydrolyseaktivität durch Etablierung begünstigender Interaktionen mit der P1- und P2-Position des Acyldonors.

Basierend auf diesen Ansätzen und den von der Trypsilgase vorliegenden Strukturdaten wurden die in Abbildung 5 grün dargestellten Aminosäurepositionen Asp95, Arg96, Leu99, Ser214, Gly219 und Ala221 für eine Randomisierung ausgewählt. Um eine randomisierte DNA-Bibliothek von möglichst hoher Qualität generieren zu können, sollten für die Randomisierung der Aminosäurepositionen Oligonukleotide eingesetzt werden, welche unter Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen synthetisiert wurden (siehe 2.2). Da auf diese Art und Weise die zur Randomisierung verwendeten Codone genau definiert werden konnten, wurden diese auf 19 Codone für 19 verschiedene kanonische Aminosäuren (ohne Cystein) beschränkt. Aus dieser Kombination von sechs Randomisierungspositionen mit 19 möglichen Codonen bzw. Aminosäuren ergibt sich eine theoretische Diversität auf DNA- und Proteinebene von $4,7 \cdot 10^7$.

Als weitere Maßnahme zur Erhöhung der Qualität der zu generierenden DNA-Bibliothek wurde im Zuge dieser Arbeit ein modulares Bibliotheksdesign in Verbindung mit einer Leserahmenselektion gewählt, welches in der Arbeitsgruppe „Künstliche Bindeproteine“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickelt wurde. Die Anwendung dieses modularen Bibliotheksdesigns und die

Ergebnisse der Analytik hinsichtlich Qualität bzw. Funktionalität der resultierenden DNA-Bibliothek sind im folgenden Abschnitt (siehe 4.1.2) detailliert dargestellt.

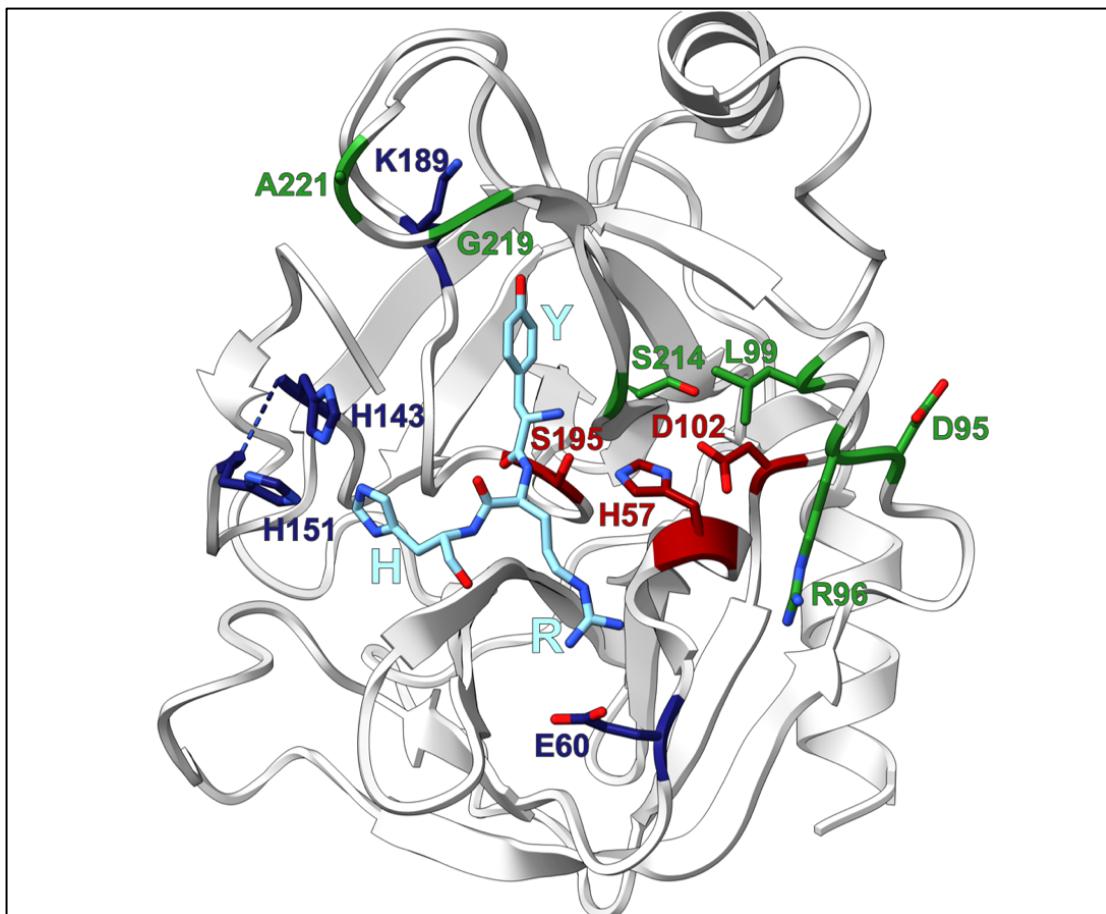


Abbildung 5: Darstellung der Proteinstruktur von Trypsilase mit dem eingebundenen YRH-Substrat und den randomisierten Aminosäurepositionen. Gezeigt ist die Tertiärstruktur von Trypsilase im Komplex mit YRH-Ecotin (PDB ID: 4NIY; Liebscher et al., 2014; Kette A). In Stäbchendarstellung hervorgehoben sind die vier Mutationen der Trypsilase K60E, N143H, E151H und D189K (dunkelblau), die Aminosäurepositionen der katalytischen Triade H57, D102 und S195 (rot) und die für eine Randomisierung ausgewählten Positionen D95, R96, L99, S214, G219 und A221 (grün). Zudem ist die eingebundene YRH-Substratsequenz in Stäbchendarstellung gezeigt (hellblau).

4.1.2 Herstellung und Qualitätskontrolle der DNA-Bibliothek

Die in dieser Arbeit verwendete Synthesestrategie im Zuge des modularen Bibliotheksdesigns ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Hierfür wurde das Trypsilase-Gen in drei konstante Fragmente (SF, IF, EF) und zwei randomisierte Fragmente (RF1, RF2) mit jeweils drei randomisierten Aminosäurepositionen aufgeteilt. Die konstanten Fragmente wurden mittels PCR (siehe 3.1.3) unter Verwendung des Plasmids pMA_4Tn-cuo-lib (siehe 2.3) und des jeweiligen Primer-Paares LibRW_SF_fwd/rev, LibRW_IF_fwd/rev oder LibRW_EF_fwd/rev (siehe 2.2)

generiert. Für die Herstellung der randomisierten Fragmente wurden die einzelsträngigen Oligonukleotide LibRW_RF1.3_sense und LibRW_RF2.3_sense (siehe 2.2) von der Ella Biotech GmbH (Martinsried) unter Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen synthetisiert. Diese Oligonukleotide wurden mittels Klenow-Fragment (siehe 3.1.4) unter Verwendung des Primers LibRW_RF_anti doppelsträngig aufgefüllt.

Alle generierten Fragmente wurden anschließend einer Leserahmenselektion nach Gerth, Patrick, & Lutz, 2004 unterzogen. Hierzu wurden die Fragmente mittels AgeI/MluI-Restriktionsverdau (siehe 3.1.5) und anschließender Ligation (siehe 3.1.6) in das Plasmid pInSALect_NWG-1 (siehe 2.3) subkloniert. Unter Verwendung dieser Ligationsprodukte wurden *E. coli* ElectroTen-Blue Zellen (siehe 2.4) transformiert (siehe 3.2.1) und auf Carbenicillin-haltigem Selektionsmedium ausplattiert. Aus den erhaltenen Transformanten wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.1.1) und die konstanten und randomisierten Fragmente mittels PCR unter Verwendung der Primer ModLibs_fwd/rev reamplifiziert. Die so einer Leserahmenselektion unterzogenen Gen-Fragmente konnten nun für die Reassemblierung des Trypsilicase-Gens bzw. der Bibliothek eingesetzt werden.

Die generelle Reihenfolge des Zusammenfügens der einzelnen Fragmente ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Für die Assemblierung zweier Fragmente wurde zunächst das 5'-seitige Fragment am 3'-Ende einem Esp3I-Restriktionsverdau und das 3'-seitige Fragment am 5'-Ende einem BsaI-Restriktionsverdau unterzogen. Die verdauten Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.8) gereinigt und im äquimolaren Verhältnis für eine Ligation eingesetzt. Das Ligationsprodukt wurde mittels PCR amplifiziert und erneut mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und konnte so für den nachfolgenden Assemblierungsschritt eingesetzt werden. Nach dem finalen Schritt wurde die vollständig reassemblierte Bibliothek wiederrum mittels PCR amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Daraufhin erfolgte die Subklonierung der Bibliothek in das Phagemid pMB04 (siehe 2.3) mittels BamHI/NcoI-Restriktionsverdau und Ligation, wodurch das die Bibliothek enthaltende Phagemid pMB04_LibRW_1.6 generiert wurde. Dieses Phagemid wurde anschließend für eine Transformation von *E. coli* 10-beta Zellen (siehe 2.4) eingesetzt, wobei insgesamt $7,5 \cdot 10^7$ cfu erhalten

werden konnten, was einer Abdeckung der Bibliotheks-Diversität um den Faktor 1,6 und nach Patrick et al., 2003 einer Vollständigkeit der Bibliothek von 79,7 % entsprach.

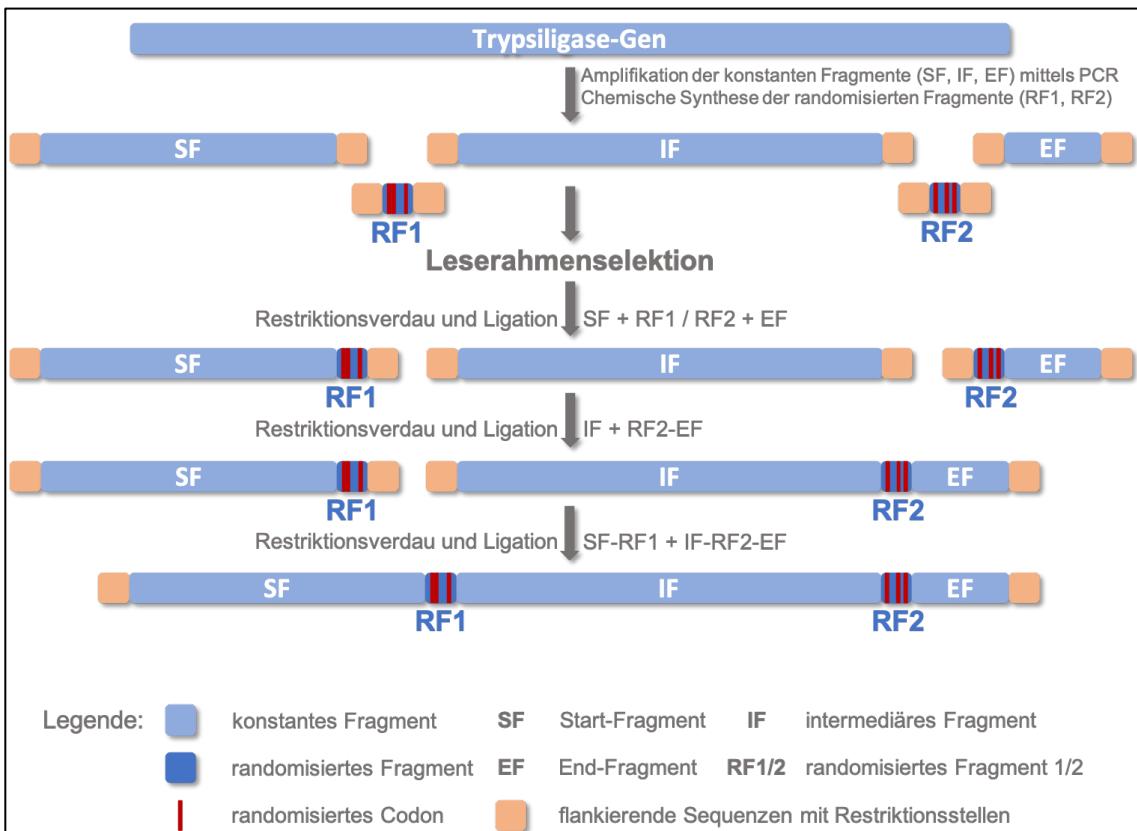


Abbildung 6: Schematische Darstellung der im Zuge des modularen Bibliotheksdesign verwendeten Synthesestrategie. Auf Basis des Gens der Trypsiligase wurden zunächst die konstanten Fragmente (SF, IF, EF) durch Amplifikation mittels PCR und die randomisierten Fragmente (RF1, RF2) mittels chemischer Synthese (Ella Biotech GmbH (Martinsried)) generiert. Alle Fragmente wurden anschließend einer Leserahmenselektion unterzogen. Daraufhin wurden die Fragmente mittels PCR reamplifiziert und anhand einer Abfolge von sequentiellen Restriktionsverdau- und Ligationsschritten bis zur vollständigen Bibliothek reassembliert. Die Bedeutung der Farbgebung und der verwendeten Abkürzungen sind der Legende zu entnehmen.

Um die Funktionalität und somit auch die Qualität der Bibliothek analysieren zu können, wurden von diesen Transformationen zudem 144 einzelne Klone für eine DNA-Sequenzierung (siehe 3.1.11) unter Verwendung des Primers Seq_pelB_pMB (siehe 2.2) eingesetzt. Bei elf der 144 sequenzierten Klone konnte das Phagemid pMB04_sfGFP identifiziert werden, welches als Vorlage für die Subklonierung der Bibliothek genutzt wurde. Hierbei handelte es sich also um transformierte Plasmid-Selbstligationen bzw. unverdautes Plasmid, weswegen diese Klone in die weitere Auswertung nicht einbezogen wurden. Bei fünf der verbliebenen 133 Klone konnten stille Mutationen detektiert werden, welche dementsprechend jedoch

keinen Einfluss auf die Funktionalität der Bibliothek haben. Neun der 133 Klone und somit 6,8 % wiesen hingegen Mutationen auf, welche zu Leserahmenverschiebungen führten. Somit konnte auf eine Funktionalität der Bibliothek auf DNA- und Protein-Ebene von 93,2 % geschlussfolgert werden.

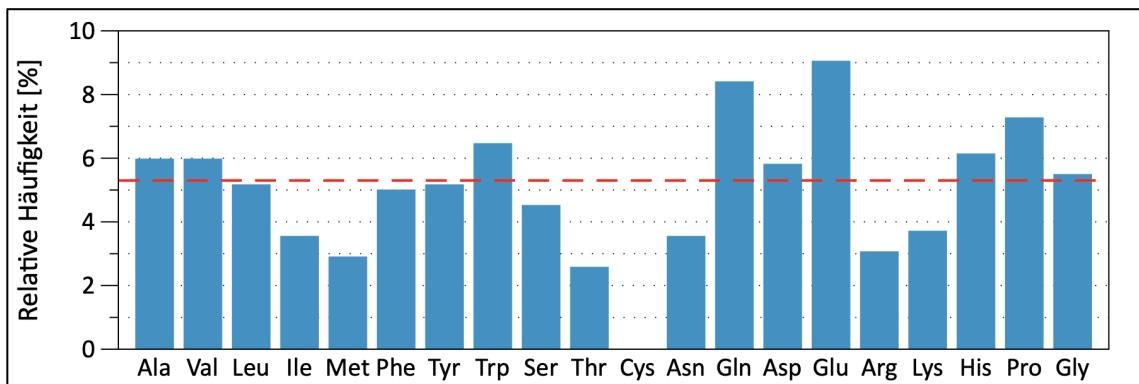


Abbildung 7: Relative Häufigkeiten der zugelassenen Aminosäuren an allen Randomisierungspositionen. Basierend auf den Sequenzierungsdaten der 133 Einzelklone wurde gezählt, wie oft eine der für die Randomisierung zugelassenen Aminosäuren an allen Randomisierungspositionen auftritt und entsprechend die relative Häufigkeit berechnet. Die rot gestrichelte Linie markiert die Wahrscheinlichkeit in Höhe von 5,3 % für das Auftreten einer der 19 verschiedenen Aminosäuren.

Neben der Funktionalität wurden auf Basis der Sequenzierungsdaten auch die relativen Häufigkeiten der an den Randomisierungspositionen auftretenden Aminosäuren bzw. den entsprechenden Codonen analysiert. Die in Abbildung 7 dargestellte Auswertung dieser relativen Häufigkeiten zeigte, dass das Vorhandensein aller 19 zugelassenen Aminosäuren bestätigt werden konnte, während die jeweiligen relativen Häufigkeiten um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von 5,3 % schwankten. Zudem konnte kein Codon für die Aminosäure Cystein oder ein Stoppcodon aufgefunden werden, was so auch im Bibliotheksdesign vorgesehen war.

Da eine hohe Funktionalität und Qualität der Bibliothek bestätigt werden konnte, wurde diese, bzw. das die Bibliothek beinhaltende Phagemid pMB04_LibRW_1.6, aus den *E. coli* 10-beta Zellen isoliert und für eine Transformation von *E. coli* ER2738 Zellen (siehe 2.4) eingesetzt, da dieser *E. coli* Zellstamm für die nachfolgende Selektion mittels Phagen-Display verwendet werden sollte. Im Zuge dieser Transformationen wurden insgesamt $2,6 \cdot 10^7$ cfu generiert. Dies entsprach einer Abdeckung der Bibliotheks-Diversität um den Faktor 0,6 und nach Patrick et al., 2003 einer Vollständigkeit der Bibliothek von 42,6 %.

4.2 Selektion optimierter Varianten mittels Phagen-Display

Unter Verwendung der zuvor generierten DNA-Bibliothek pMB04_LibRW_1.6 (siehe 2.3) sollte nun eine Selektion mittels Phagen-Display durchgeführt werden, um verbesserte Varianten anreichern zu können. Die Durchführung der Selektion ist unter Abschnitt 3.4 detailliert beschrieben. In jeder Selektionsrunde wurden M13 Bakteriophagen hergestellt, welche die Trypsilase-Varianten der DNA-Bibliothek monovalent präsentieren. Diese Bakteriophagen wurden daraufhin mit dem Substratpeptid Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH (siehe 2.8), welches zuvor an magnetischen M-270 Beads immobilisiert wurde, inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution gebundener Phagen durch Zugabe des Nukleophilpeptids H-RHAAGEQKLISEEDL-OH. Insgesamt wurden vier Selektionsrunden durchgeführt. Dabei wurde der Selektionsdruck von Runde zu Runde erhöht, indem die Substratmenge, Nukleophilpeptid-Konzentration und Inkubationszeit während der Elution verringert wurden, während die Anzahl der Waschschritte erhöht wurde.

Wie unter 3.4.1 und 3.4.3 beschrieben, wurden in jeder Selektionsrunde die Phagentiter der jeweils eingesetzten Phagen-Lösungen, sowie der Wasch- und Elutionsfraktionen, bestimmt. Aus den ermittelten Phagentitern und den Volumina der jeweiligen Fraktionen konnten so die Phagen-Mengen in cfu berechnet werden. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind sowohl für die Menge an eingesetzten Phagen als auch der Menge an Phagen nach Waschen und Elution für jede Selektionsrunde in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Übersicht der im Zuge des Phagen-Display bestimmten Phagen-Mengen der einzelnen Selektionsrunden. Gezeigt sind die Phagen-Mengen in cfu, welche in den jeweiligen Selektionsrunden eingesetzt bzw. in der jeweils letzten Waschfraktion und Elutionsfraktion enthalten waren.

Selektionsrunde	1	2	3	4
Eingesetzte Phagen [cfu]	$2,0 \cdot 10^{11}$	$8,8 \cdot 10^{11}$	$2,8 \cdot 10^{10}$	$6,5 \cdot 10^{10}$
Phagen nach Waschen [cfu]	$5,0 \cdot 10^5$	$9,7 \cdot 10^5$	$7,6 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4$
Eluierte Phagen [cfu]	$1,1 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^4$

4.3 Screening zur Identifikation optimierter Varianten

Während die Selektion mittels Phagen-Display (siehe 4.2) zur Anreicherung optimierter Varianten diente, mussten dieses nun aus dem Pool der angereicherten Varianten identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA-basiertes Screening im Hochdurchsatz-Format angewendet, welches im Zuge der Promotion von Herrn Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)) etabliert wurde. Hierfür musste jedoch zunächst die rekombinante Herstellung von Trypsiligase im Mikrotiterplatten-Maßstab validiert werden.

4.3.1 Validierung der Biosynthese von Trypsiligase im MTP-Format

Für die Identifikation von optimierten Varianten unter Verwendung des ELISA-basierten Screenings musste sichergestellt werden, dass die rekombinante Herstellung in *P. pastoris* X33 im MTP-Format ausreichende Enzymengen und damit enzymatische Aktivität liefert, um im betrachteten Reaktionszeitraum detektierbare Signalintensitäten zu erzielen. Aufgrund dessen sollte die Biosynthese im MTP-Format anhand von Trypsiligase als Ausgangsvariante validiert werden. Hierfür musste zunächst das Gen der Trypsiligase in den Expressionsvektor pPICZ α A (siehe 2.3) subkloniert werden. Zu diesem Zweck wurde das Gen unter Verwendung des Primerpaars pPICZ_BsaI_fwd/rev (siehe 2.2) und des Plasmids pMA_4Tn-cuo-lib (siehe 2.3) mittels PCR (siehe 3.1.3) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.8) gereinigt und einem BsaI-Restriktionsverdau (siehe 3.1.5) unterzogen, wodurch Überhänge der Restriktionsenzyme AgeI/XhoI generiert wurden. Des Weiteren wurde das Plasmid pPICZ α A einem AgeI/XhoI-Restriktionsverdau unterzogen und nach Reinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese zusammen mit dem verdauten PCR-Produkt für eine Ligation (siehe 3.1.6) eingesetzt. Das Ligationsprodukt wurde für eine Transformation (siehe 3.2.1) von *E. coli* 5-alpha (siehe 2.4) verwendet und der Ansatz auf Zeocin-haltigem LBLS-Agar (siehe 2.5) ausgestrichen. Unter Verwendung einer Zellkolonie der Agarplatte wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.1.1) und die erfolgreiche Subklonierung bzw. Generierung des Plasmids pPICZ α A_4Tn mittels DNA-Sequenzierung (siehe 3.1.11) bestätigt. Der so generierte Expressionsvektor wurde nun für eine Transformation elektrokompetenter *P. pastoris* X33

Zellen (siehe 3.2.3) eingesetzt. Die Biosynthese von Trypsilagase im MTP-Maßstab erfolgte nun wie unter 3.5.1 beschrieben und unter Verwendung der mit pPICZ α A_4Tn transformierten *P. pastoris* X33 Zellen. Nach insgesamt 120 h Inkubation der MTP-Expression wurden 4 μ l der Kulturen je Kavität abgenommen und eine 1:50-Verdünnung in 196 μ l BMM-Medium (siehe 2.5) angefertigt. Unter Verwendung des SpectraMax® Paradigm® MTP-Reader (siehe 2.11) wurde die OD_{600} dieser Verdünnungen gemessen und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Ergebnisse dieser OD_{600} -Messungen sind in Abbildung 8C dargestellt.

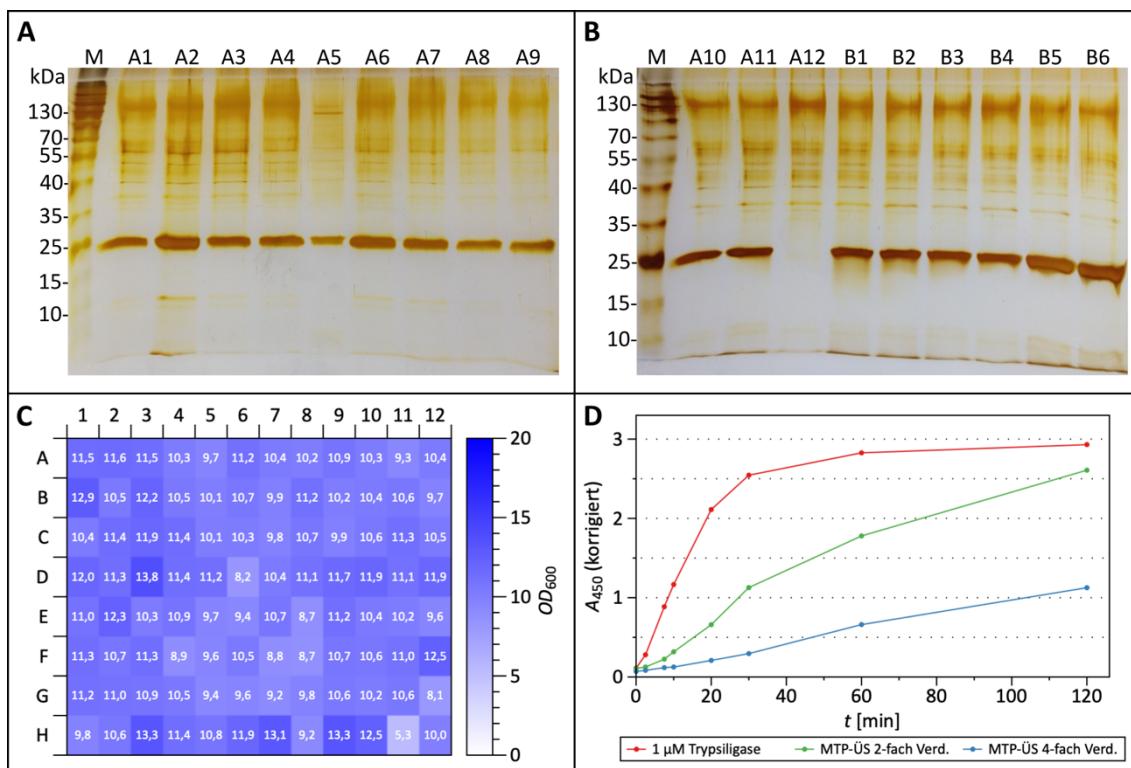


Abbildung 8: Validierung der Biosynthese von Trypsilagase im MTP-Format. **A-B)** SDS-PAGE zur Detektion rekombinant hergestellter Trypsilagase in ausgewählten Kavitäten. Jeweils 20 μ l der Überstände nach Zentrifugation wurden abgenommen, mit 6 μ l 3x SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte mittels Silberfärbung. M = *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa*; A1-B6 = Kavitäten der MTP-Biosynthese **C)** Heatmap zur Darstellung der gemessenen OD_{600} -Werte in den einzelnen Kavitäten. Es wurden jeweils 4 μ l je Kavität der Kulturen abgenommen und in 196 μ l BMM-Medium auf einer Microplatte 96-well PS F-Boden überführt. Unter Verwendung des SpectraMax® Paradigm® MTP-Reader wurden die OD_{600} je Kavität gemessen. **D)** Aktivitätsnachweis unter Verwendung der umgepufferten Überstände der MTP-Biosynthese mittels ELISA. Es wurden Transamidierungsreaktionen unter Verwendung der 2-fach (grün) und 4-fach (blau) verdünnten, umgepufferten Überstände und 1 μ M Trypsilagase als Referenz (rot) angesetzt und mittels ELISA auf die Produktbildung hin analysiert. Reaktionsbedingungen: 50 μ M Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH; 100 μ M H-RHAAGEQKLISEEDL-OH; 200 μ M ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln.

Die ermittelten OD_{600} -Werte schwankten dabei um einen Mittelwert von 10,6 bei einer Standardabweichung von 1,2, was für ein weitestgehend homogenes

Zellwachstum sprach. Lediglich die Kavität H11 wich hier mit einer OD_{600} von nur 5,3 stärker vom Mittelwert ab. Um den Gehalt an rekombinant hergestellter Trypsiligase in der MTP-Biosynthese untersuchen zu können, wurde eine Analyse mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.4) unter Verwendung der Überstände (je 20 µl) von den Kavitäten A1-B6 durchgeführt (Abbildung 8A-B). Die Detektion der Proteine erfolgte hierbei mittels Silberfärbung. In nahezu allen Kavitäten konnte eine Proteinbande bei ca. 25 kDa gefunden werden, welche der Bande von Trypsiligase mit einem Molekulargewicht von 23843 Da entsprach. Zudem war die Bandenintensität weitestgehend konstant, was auf eine gleichmäßige Biosynthese der Trypsiligase in den verschiedenen Kavitäten deutete. Lediglich für den Überstand der Kavität A12 konnte keine Proteinbande bei 25 kDa detektiert werden.

Die enzymatische Aktivität der hergestellten Trypsiligase war hier als das wichtigste Kriterium im Zuge der Validierung anzusehen, weswegen unter Verwendung der generierten und umgepufferten Überstände ein Aktivitätsnachweis mittels ELISA (siehe 3.5.2) durchgeführt wurde. Dabei wurden die Überstände in einer 2-fach und 4-fach Verdünnung eingesetzt und zudem 1 µM gereinigte Trypsiligase als Referenz mitgeführt. Die entsprechende Auftragung der gemessenen und korrigierten A_{450} -Werte, welche mit der Menge an entstandenem Aminolyseprodukt korrelieren, gegen die Reaktionszeit (Abbildung 8D) zeigte eine deutliche und Konzentrations-abhängige, enzymatische Aktivität von Trypsiligase an, wobei die Referenz mit 1 µM Trypsiligase die schnellste Produktbildung zeigte. Aus diesem Grund wurde im anschließenden ELISA-basierten Screening auf eine zusätzliche Verdünnung der Überstände verzichtet. Anhand der Ergebnisse konnte die Biosynthese von Trypsiligase im MTP-Format validiert werden, was eine erfolgreiche Biosynthese der angereicherten Varianten im Screening ermöglichen sollte.

4.3.2 Screening im Hochdurchsatz-Format

Die Durchführung, welche im Wesentlichen aus zwei Schritten besteht (Biosynthese im MTP-Format und ELISA-basiertes Screening), ist unter 3.5.3 und 3.5.4 detailliert beschrieben. Für das Screening mussten die Gene der angereicherten Varianten zunächst in den Expressionsvektor pPICZ α A subkloniert werden, da für die Biosynthese der Einzelvarianten *P. pastoris* genutzt werden sollte. Diese

Subklonierung wurde anhand einer Megaprimer-Mutagenese (siehe 3.1.7) durchgeführt, wobei als Template das Plasmid pPICZ α A_4Tn eingesetzt wurde. Hierbei musste sichergestellt werden, dass der Anteil des Plasmids pPICZ α A_4Tn nach der Megaprimer-PCR und DpnI-Verdau möglichst gering ist, um ein hohes Hintergrundsignal durch das mitgeführte Wildtyp-Trypsilicase-Gen während des Screenings zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurde eine Negativkontrolle in der Megaprimer-PCR mitgeführt, bei welcher kein Megaprimer hinzugefügt wurde. Nach Transformation von *E. coli* 5-alpha mit den beiden PCR-Ansätzen konnte so das Verhältnis der erreichten cfu bestimmt werden, welches bei 772:1 (Varianten:Trypsilicase) lag. Nach anschließender Transformation von *P. pastoris* X33 mit dem soeben generierten Plasmid pPICZ α A_LibRW_1.6_Out_Rd4, welches die Gene der nach vier Selektionsrunden angereicherten Varianten enthielt, wurden insgesamt 368 Einzelklone gepickt und in ein MTP-Format als Glycerolstocks überführt. Diese Glycerolstocks wurden daraufhin für die Biosynthese von Einzelvarianten im MTP-Format verwendet und die dabei generierten, umgepufferten Überstände für das ELISA-basierte Screening eingesetzt.

Das Funktionsprinzip des Screenings beruhte auf dem direkten Nachweis des Transamidierungsproduktes mittels ELISA. Hierfür wurden Transamidierungsreaktionen im MTP-Format angesetzt, wobei den Einzelvarianten das Edukt Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH und das Nukleophil-Peptid H-RHAAGEQKLISEEDL-OH zugesetzt wurden. Das verwendete Nukleophil-Peptid beinhaltete dabei einen C-terminalen c-Myc-Tag (H-EQKLISEEDL-OH). Bei Vorhandensein einer aktiven Trypsilicase-Variante kam es nun zur Bildung des Hydrolyseproduktes Biotin-PEG-GAAY-OH bzw. des Aminolyseproduktes Biotin-PEG-GAAYRHAAGEQKLI-SEEDL-OH. Die Reaktionen wurden zu definierten Zeitpunkten (5; 30; 60 und 150 min) abgestoppt und auf Streptavidin-beschichtete 384-well MTPs überführt. Hierdurch wurde das biotinylierte Edukt sowie das Hydrolyse- und Aminolyseprodukt immobilisiert, während das überschüssige Nukleophil-Peptid durch Waschen entfernt wurde. Nun konnte das immobilisierte Aminolyseprodukt mittels ELISA unter Verwendung eines c-Myc-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Da die Menge des gebundenen, primären bzw. HRP-konjugierten, sekundären Antikörpers direkt vom prozentualen Anteil des Aminolyseproduktes abhängig war,

korrelierte somit die Signalintensität der normierten Absorption bei 450 nm direkt mit der prozentualen Ausbeute des Aminolyseproduktes.

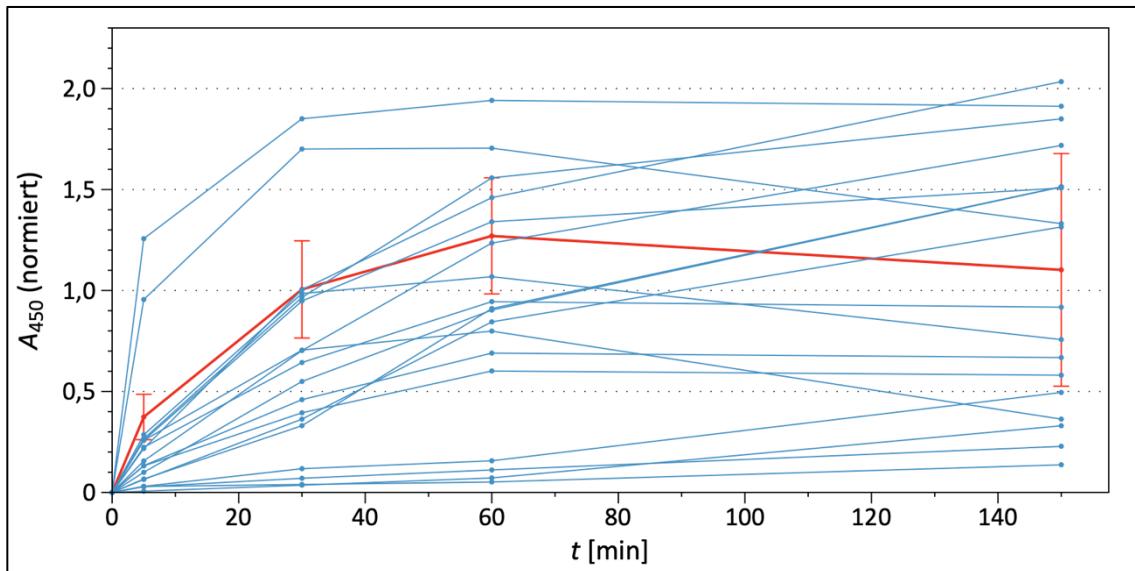


Abbildung 9: Progresskurven der im ELISA-basierten Screening identifizierten 18 Varianten. Dargestellt sind die gemessenen und normierten Absorptionen bei 450 nm der 18 identifizierten Varianten (blau; Einzelbestimmungen), welche gegen die Reaktionszeit aufgetragen wurden. Dabei korreliert die normierte A_{450} mit der Produktbildung. Die rote Progresskurve zeigt die gemittelten Messwerte aller auf den MTP mitgeführten Trypsiligase-Referenzkontrollen.

Von 368 gescreenten Einzelvarianten konnten 18 (4,9 %) identifiziert werden, die eine Transamidierungsaktivität zeigten. In Abbildung 9 sind die Progresskurven dieser 18 Varianten dargestellt, welche sich aus der Auftragung der normierten Absorptionen bei 450 nm gegen die Reaktionszeit ergaben (siehe S. 60). Als Referenz ist die Progresskurve für Trypsiligase in Rot aufgetragen, welche sich aus den gemittelten Progresskurven aller auf den Mikrotiterplatten mitgeführten Trypsiligase-Kontrollen ergab. Neun der 18 identifizierten Varianten zeigten im betrachteten Reaktionszeitraum höhere Signalintensitäten als die gemittelte Trypsiligase-Referenz. Insbesondere Variante 1C11 ragte hier hervor, da jene Variante die schnellste Zunahme der Signalintensität zeigte und eine erreichte A_{450} von 1,94 nach 60 min Reaktionszeit auf eine im Vergleich zu Trypsiligase (A_{450} (60 min) = 1,27) erhöhte Ausbeute an Aminolyseprodukt hinwies. Daneben zeigte Variante 4C12 die höchste erreichte Signalintensität nach 150 min Reaktionszeit von $A_{450} = 2,03$. Die verwendete Nomenklatur für die Benennung der Enzymvarianten geht auf die Lokalisierung dieser Varianten auf den entsprechenden Glycerolstock-Mikrotiterplatten zurück (1C11 bedeutet Kavität C11 auf Platte 1).

4.4 Primäre Charakterisierung identifizierter Trypsilicase-Varianten

Nachdem im Zuge des ELISA-basierten Screenings mehrere potentiell optimierte Variante identifiziert werden konnten, galt es nun, diese Varianten einer primären Charakterisierung zu unterziehen, um insbesondere hinsichtlich der katalytischen Syntheseeffizienz diskriminieren zu können. Hierfür sollten alle Varianten zunächst sequenziert werden, was Informationen über die an den randomisierten Positionen auftretenden Mutationen liefern sollte. Daraufhin sollten die funktionalen Einzelvarianten rekombinant hergestellt werden, um sie anschließend anhand von Transamidierungsstudien für eine primäre, enzymkinetische Charakterisierung verwenden zu können.

4.4.1 Sequenzierung der identifizierten Varianten

Zur Sequenzierung der im Zuge des Screenings identifizierten Varianten musste zunächst die genomische DNA der *P. pastoris* Zellen isoliert werden (siehe 3.1.2). Anschließend wurden die Gene der Varianten mittels PCR (siehe 3.1.3) unter Verwendung der Primer pPICZ_seq_fwd und pIB4_4Tn_rev (siehe 2.2) amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.8) gereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden daraufhin für eine DNA-Sequenzierung (siehe 3.1.11) unter Verwendung des Primers pPICZ_seq_fwd eingesetzt.

Bei fünf der im Zuge des Screenings identifizierten und nun sequenzierten 18 Varianten bzw. *P. pastoris* Transformanten wurden multiple Insertionen von Genen der Trypsilicase-Varianten vorgefunden, was sich anhand von Überlagerungen der Signale verschiedener Nukleotide an den randomisierten Positionen zeigte. Demzufolge konnten die Codone und somit Mutationen an den randomisierten Positionen nicht aufgelöst werden, weswegen diese Varianten im Zuge der weiteren Charakterisierung nicht mehr berücksichtigt wurden. Bei weiteren fünf der 18 Varianten wurde durch die Sequenzierung das Gen der Trypsilicase identifiziert. Angeichts der Tatsache, dass sich die für die Randomisierung verwendeten Codone für die verschiedenen Aminosäuren von jenen, welche im Gen der Trypsilicase als Ausgangsvariante enthalten sind, unterschieden, konnte hier klar diskriminiert werden, ob es sich um das Gen der Ausgangsvariante handelte oder aber um die zufällige Wiederfindung der Trypsilicase in der Bibliothek. Hier war Ersteres der Fall,

sodass es sich um das Gen der Trypsiligase aus dem Plasmid pPICZ α A_4Tn handelte (siehe auch 4.3.2).

Tabelle 17: Übersicht der Sequenzierungsergebnisse von acht identifizierten Varianten. Dargestellt sind die an den randomisierten Positionen auftretenden Aminosäuren bzw. Mutationen, welche sich aus den Ergebnissen der Sequenzierung ergeben. Die Farbcodierung richtet sich nach den physikochemischen Eigenschaften der Aminosäureseitenketten (Grün = polar; Orange = unpolar/aromatisch; Rot = sauer; Blau = basisch), wobei die Zuordnung hinsichtlich der Polarität nach Radzicka & Wolfenden, 1988 erfolgte.

Variante	Positionen/Mutationen					
Trypsiligase	D95	R96	L99	S214	G219	A221
1A12	S	A	M	A	E	A
1C11	D	V	F	G	S	G
2B9	E	E	F	A	D	W
2C11	E	P	L	S	G	A
3G2	I	F	M	S	G	A
4C12	W	P	Y	S	E	V
4E1	Y	Q	W	S	G	A
4F8	V	S	F	G	P	I

Die Ergebnisse der Sequenzierungen der verbliebenen acht Varianten sind in Tabelle 17 dargestellt. Auffällig waren hier die Varianten 2C11, 3G2 und 4E1, bei welchen an den Positionen 214; 219 und 221 die gleichen Codone wie bei Trypsiligase auftraten. Wie zuvor bereits beschrieben, liegt der Ursprung dieser Codone nicht in der Bibliothek, sondern im Gen der Trypsiligase (siehe auch Kapitel 5.3). Insbesondere für Position 214 ließ sich aus den Sequenzierungsdaten ein Konsensus-Motiv ableiten, da trotz Randomisierung und somit dem möglichen Auftreten von 19 verschiedenen Aminosäuren nur die Aminosäuren Alanin, Glycin und Serin an dieser Position vorgefunden wurden. Weiterhin wurden an den Positionen 99 und 221 nur unpolare bzw. aromatische Aminosäureseitenketten identifiziert.

4.4.2 Rekombinante Herstellung der identifizierten Varianten

Um die acht funktionalen Einzelvarianten, welche im Zuge der Sequenzierung (siehe 4.4.1) erfolgreich ermittelt werden konnten, insbesondere hinsichtlich ihres synthetischen Potentials anhand von Transamidierungsstudien näher

charakterisieren zu können, mussten diese nun rekombinant hergestellt und chromatografisch gereinigt werden. Die Biosynthese erfolgte dabei, wie unter 3.2.4 beschrieben, rekombinant in *P. pastoris* X33. Hierfür wurden die im Zuge des Screenings generierten Glycerolstock-Mikrotiterplatten (siehe 3.5.3 und 4.3.2) verwendet, um die entsprechenden Einzelklone auf YPDS-Agarplatten zu überführen. Nach einer Inkubation für 72 h bei 30 °C wurden diese Agarkulturen für die Inkokulation der Vorkulturen zur Biosynthese verwendet. Schließlich wurde der Kulturüberstand nach der Biosynthese, welcher die sezernierten Enzymvarianten enthielt, für eine Zweischritteinigung, bestehend aus einer Kationenaustausch-Chromatografie und einer Größenausschluss-Chromatografie, eingesetzt.

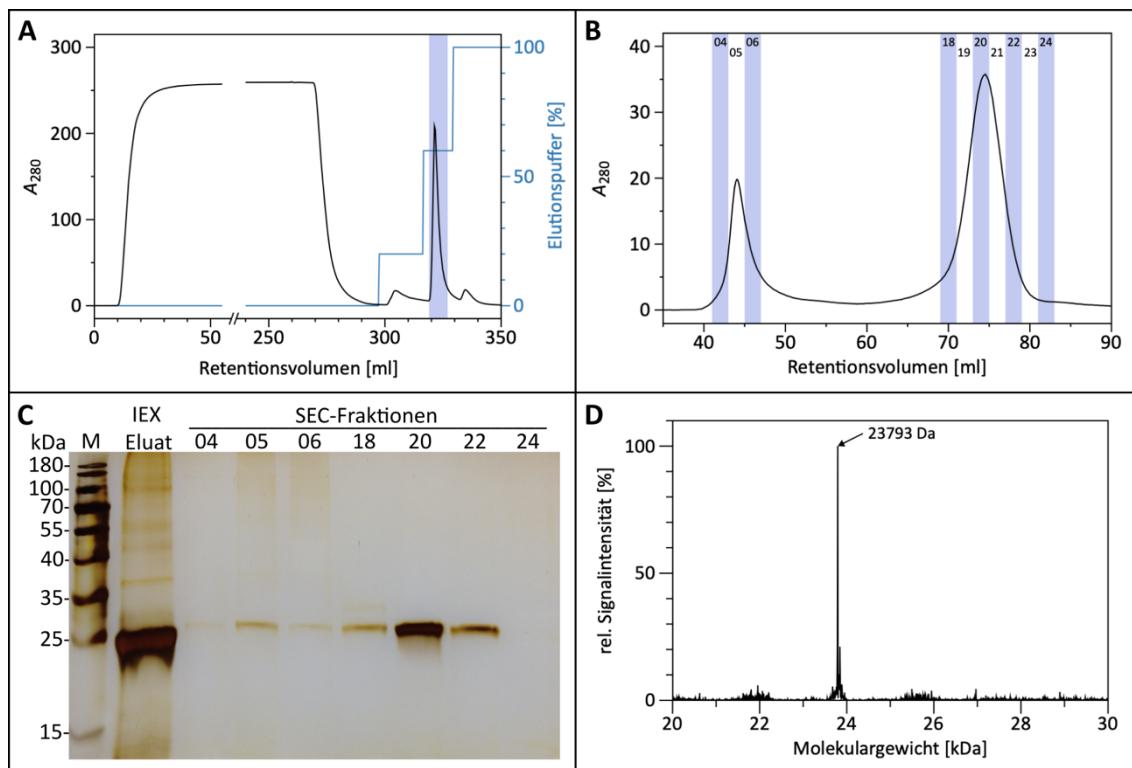


Abbildung 10: Chromatografische Reinigung der Trypsilagase-Variante 1C11. A) Dargestellt ist das Chromatogramm der Kationenaustausch-Chromatografie von Variante 1C11. Die blau gekennzeichneten Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und für die nachfolgende Größenausschluss-Chromatografie eingesetzt. B) Gezeigt ist das Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatografie von Variante 1C11. Die mittels SDS-PAGE analysierten Fraktionen sind entsprechend gekennzeichnet. Die Fraktionen 18-23 wurden vereinigt und konzentriert. C) Analyse der vereinigten Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatografie (IEX Eluat) sowie ausgewählter Fraktionen der Größenausschluss-Chromatografie (SEC) mittels SDS-PAGE. Jeweils 20 µl Probe wurden mit 6 µl 3x SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte mittels Silberfärbung. M = *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa*. D) LC/MS-Analytik der gereinigten und konzentrierten Variante 1C11 ($M_{ber.} = 23793,8 \text{ Da}$; $M_{gem.} = 23793 \text{ Da}$).

Die Durchführung dieser chromatografischen Reinigung ist unter 3.3.2 detailliert beschrieben. In Abbildung 10 ist der Reinigungsverlauf für die Trypsilicase-Variante 1C11 exemplarisch dargestellt. Mittels Kationenaustausch-Chromatografie wurde Variante 1C11 zunächst aus dem Kulturüberstand isoliert (Abbildung 10A), wobei ein Stufengradient mit 60 % Elutionspuffer angewendet wurde. Im zweiten Reinigungsschritt mittels Größenausschluss-Chromatografie konnte daraufhin die monomere Enzymspezies bei einem Retentionsvolumen von 70-80 ml fraktioniert werden (Abbildung 10B). Mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.4) wurde anschließend das Eluat der Kationenaustausch-Chromatografie sowie ausgewählte Fraktionen der Größenausschluss-Chromatografie analysiert (Abbildung 10C). Anhand der Proteinbanden bei ca. 25 kDa konnte so das Vorhandensein der Variante 1C11 ($M_{ber.} = 23793,8$ Da) in den Fraktionen 18-22 bestätigt werden. Jedoch konnten auch schwache Banden bei gleicher Größe in den Fraktionen 4-6 detektiert werden. Diese Fraktionen entsprachen dabei einem Retentionsvolumen von ca. 40-50 ml, was dem Ausschlussvolumen der verwendeten HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule (siehe 2.10) gleichkam. Da anhand der Analyse mittels SDS-PAGE auch eine hohe Reinheit der Variante 1C11 in den Fraktionen 18; 20 und 22 bestätigt werden konnte, wurden die Fraktionen 18-23 vereinigt und konzentriert. Daraufhin wurde sowohl die Identität als auch die Reinheit der präparierten Trypsilicase-Variante 1C11 mittels LC/MS-Analytik (siehe 3.3.5) verifiziert (Abbildung 10D).

Tabelle 18: Übersicht der erhaltenen Ausbeuten je Liter Kulturmedium aller rekombinant hergestellten und gereinigten Varianten. Ausbeute für Trypsilicase nach Böhme, 2021.

Variante	Ausbeute [mg/l Kultur]	Variante	Ausbeute [mg/l Kultur]
Trypsilicase	14,3	3G2	3,9
1A12	5,6	4C12	4,8
1C11	3,1	4E1	3,5
2B9	6,4	4F8	3,4
2C11	8,8		

Die finale Ausbeute nach Biosynthese und chromatografischer Reinigung der Trypsilicase-Variante 1C11 lag bei 3,1 mg/l Kulturmedium. In Tabelle 18 sind die erreichten Ausbeuten aller hergestellten Varianten wiedergegeben.

Dementsprechend lagen die erreichten Ausbeuten für alle Varianten unter jener, welche für die Biosynthese von Trypsiligase in *P. pastoris* X33 beobachtet werden konnte (Böhme, 2021).

4.4.3 Transamidierungsstudien anhand der identifizierten Varianten

Nachdem alle identifizierten Varianten erfolgreich in *P. pastoris* X33 rekombinant hergestellt werden konnten, sollten diese nun hinsichtlich ihres synthetischen Potentials einer primären Charakterisierung unterzogen werden. Hierbei war natürlich vorrangig von Interesse, inwieweit die maximal erreichbare Ausbeute an Aminolyseprodukt gesteigert werden konnte. Dazu wurden Transamidierungsstudien, wie unter 3.6.1 beschrieben, durchgeführt, wobei die identifizierten und rekombinant hergestellten Trypsiligase-Varianten sowie Trypsiligase als Referenz eingesetzt wurden. Im Zuge dieser Transamidierungsreaktionen wurde zudem das Substrat-Peptid Bz-AAYRHAAG-OH mit einer Konzentration von 250 µM und ein zweifacher Überschuss des Nukleophil-Peptides H-RHAK-OH (500 µM) verwendet. Neben der maximal erreichten Ausbeute an Aminolyseprodukt wurden weiterhin die apparenten Wechselzahlen der Aminolyse- und Hydrolyseaktivität bestimmt. Für die Bestimmung der apparenten Wechselzahl der Aminolyseaktivität wurde die Reaktionsgeschwindigkeit aus dem initialen Anstieg der Produktbildung mittels linearer Regression ermittelt und mit der eingesetzten Enzymkonzentration dividiert. Im Gegensatz dazu wurde für die Hydrolyseaktivität der gesamte Reaktionszeitraum für die lineare Regression herangezogen. Aus den so ermittelten apparenten Wechselzahlen wurde zusätzlich der Quotient aus Aminolyse- durch Hydrolyseaktivität berechnet.

Die Ergebnisse dieser Transamidierungsstudien sind in Tabelle 19 dargestellt. So konnte im Vergleich zu Trypsiligase mit einer maximalen Ausbeute von 41,1 % für alle acht identifizierten Varianten eine höhere maximale Ausbeute festgestellt werden. Gleichzeitig korrelierte eine Zunahme der maximalen Ausbeute weitestgehend mit einer Steigerung des Quotienten der apparenten Wechselzahlen (Aminolyse/Hydrolyse). Dabei erreichten die Varianten 1C11 und 4F8 mit 61,7 bzw. 55,9 die höchsten Quotienten, welche damit ca. um Faktor 17-19 höher waren als für Trypsiligase. Diese beiden Varianten erreichten damit auch folgerichtig die

höchsten maximalen Ausbeuten von 61,8 % (1C11) und 61,9 % (4F8). Beachtlich war hierbei, dass beide Varianten im Vergleich zu Trypsilicase eine um den Faktor 3-4 verringerte Aminolyseaktivität zeigten. Dieser Umstand wurde jedoch durch eine um den Faktor 50-70 verringerte Hydrolyseaktivität zugunsten der Syntheseeffizienz kompensiert.

Tabelle 19: Übersicht zur primären Charakterisierung der identifizierten Trypsilicase-Varianten. Gezeigt sind die Ergebnisse der Sequenzierung der identifizierten Varianten sowie die anhand von Transamidierungsstudien ermittelten Werte zur maximalen Ausbeute und apparenten Wechselzahlen der Aminolyse- und Hydrolyseaktivität im Vergleich mit Trypsilicase (Statistik siehe 3.9). Weiterhin wurde jeweils der Quotient der apparenten Wechselzahlen berechnet. Reaktionsbedingungen: 2,5-20 µM Enzym, 250 µM Bz-AAYRHAAG-OH, 500 µM H-RHAK-OH, 100 µM ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. AL = Aminolyse, HL = Hydrolyse

Variante	Positionen/Mutationen						max. Ausbeute [%]	k _{cat app} (AL) [s ⁻¹]	k _{cat app} (HL) [s ⁻¹]	k _{cat app} (AL)/ k _{cat app} (HL)
Trypsilicase	D95	R96	L99	S214	G219	A221	41,1	0,0449	0,0142	3,2
1C11	D	V	F	G	S	G	61,8	0,0156	0,0003	61,7
4F8	V	S	F	G	P	I	61,9	0,0114	0,0002	55,9
2B9	E	E	F	A	D	W	55,7	0,1007	0,0059	17,0
4C12	W	P	Y	S	E	V	54,3	0,0552	0,0033	16,7
1A12	S	A	M	A	E	A	50,9	0,0123	0,0015	8,2
3G2	I	F	M	S	G	A	48,7	0,0353	0,0054	6,6
4E1	Y	Q	W	S	G	A	50,3	0,0644	0,0106	6,1
2C11	E	P	L	S	G	A	44,5	0,0418	0,0094	4,4

Zusammenfassend konnten also die Trypsilicase-Varianten 1C11 und 4F8 als die beiden vielversprechendsten Varianten im Zuge der primären Charakterisierung identifiziert werden. Dementsprechend sollten diese beiden Varianten für eine weitere und detaillierte Charakterisierung verwendet werden, um ihre Eignung als Biokatalysator für die praxisorientierte Anwendung eruieren zu können.

4.5 Studien zur Erkennungssequenz der Varianten 1C11 und 4F8

Im Zuge der Charakterisierung der Trypsilicase-Varianten 1C11 und 4F8 sollte zunächst untersucht werden, inwieweit die Enzymspezifität der Trypsilicase als Ausgangsvariante für die Erkennungssequenz YRH durch die eingeführten Mutationen beeinflusst wurde. Zu diesem Zweck wurden Hydrolysestudien (siehe 3.6.2)

unter Verwendung der beiden Varianten und einer Peptid-Bibliothek durchgeführt. Die in dieser Peptid-Bibliothek enthaltenen Substrat-Peptide unterschieden sich dabei durch Variation der Aminosäuren innerhalb der Erkennungssequenz. So bestanden alle Peptide aus der allgemeinen Aminosäuresequenz Bz-AAX_{P1}X_{P1'}X_{P2}AAG-OH und wiesen dementsprechend unterschiedliche Aminosäuren in P1-, P1'- und P2'-Position auf. Im Rahmen der Hydrolysestudien wurden Progresskurven generiert, indem die gemessenen Konzentrationen an Hydrolyseprodukt gegen die Reaktionszeit aufgetragen wurden (Abbildung 11B). Aus diesen Progresskurven wurden mittels linearer Regression die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt und durch Division mit der eingesetzten Enzymkonzentration die apparenten Wechselzahlen berechnet (Abbildung 11A).

Die hierbei generierten Daten wiesen auf eine breite Akzeptanz verschiedener Erkennungssequenzen durch die Varianten 1C11 und 4F8 hin. Dabei zeigten sie eine Präferenz für unpolare bzw. aromatische Aminosäureseitenketten in P1-Position. Die Substitution des Tyrosins in P1-Position durch Leucin, Tryptophan oder Phenylalanin führte hier zu einer Steigerung der Hydrolyseaktivität um den Faktor 3,3-4,6. Im Gegensatz dazu führte ein Austausch an dieser Position mit Alanin, Arginin oder Asparaginsäure zu keiner messbaren Hydrolyseaktivität. In der P1'-Position führte der Austausch des Arginins mit der gleichermaßen basischen Aminosäure Lysin zu einer um den Faktor 4,4 gesteigerten Hydrolyseaktivität für beide Varianten, während hier ebenfalls eine Asparaginsäure bei nahezu gleichbleibender Hydrolyseaktivität toleriert wurde. Die Substitution des Histidins in P2'-Position mit polaren Aminosäuren wie Asparaginsäure oder Asparagin hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit. Eine Substitution zu Alanin an dieser Position führte hier jedoch zur Inaktivität. Die Auswertung der hier aufgeführten Hydrolysestudien war jedoch insofern problematisch, als dass die aufgenommenen Progresskurven keine linearen Reaktionsverläufe zeigten, wie es für die Hydrolysereaktion zu erwarten gewesen wäre. Durch den Vergleich der in Abbildung 11B dargestellten Progresskurven mit den gleichfarbigen Funktionen der linearen Regression (gestrichelte Linie) wurde deutlich ersichtlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Reaktionszeit abnahm. Dieser Umstand war darauf zurückzuführen, dass die durch die Hydrolysereaktion frei werdenden

Aminogruppen der abgespaltenen Peptide in Folgereaktionen als Nukleophile bzw. Acyl-Akzeptoren fungierten und so zur Rückbildung des Eduktes in einer Aminolysereaktion führten. Dementsprechend konnte im Rahmen dieser Hydrolysestudien nicht die reine Hydrolysereaktion betrachtet werden.

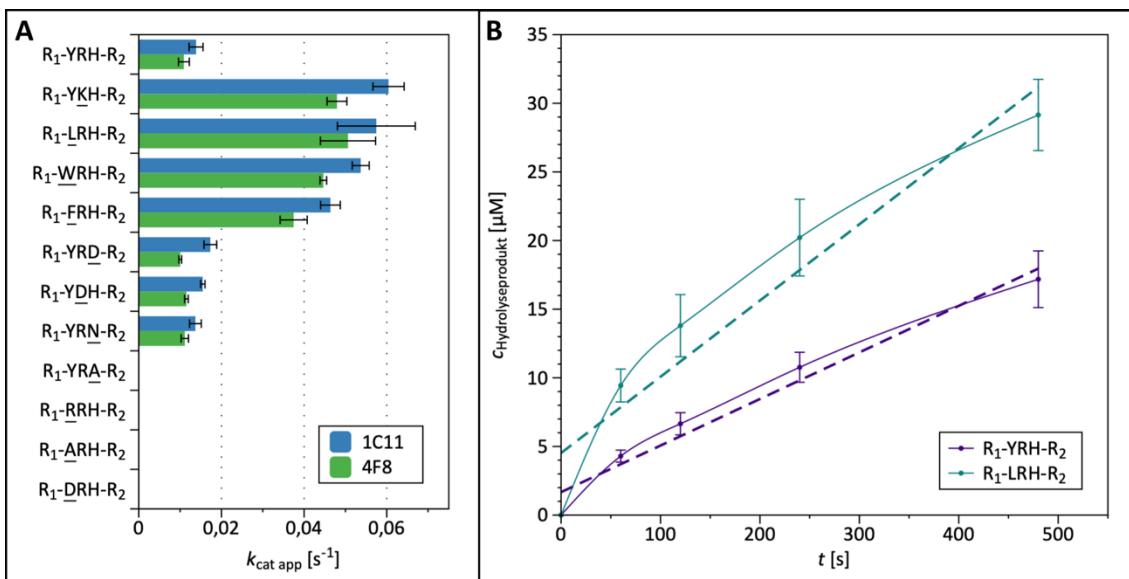


Abbildung 11: Hydrolyseaktivität der Varianten 1C11 und 4F8 unter Verwendung verschiedener Erkennungssequenzen. A) Gezeigt sind die apparenen Wechselzahlen der Hydrolyseaktivität von Variante 1C11 und 4F8 unter Verwendung verschiedener Substrat-Peptide mit Variation der Aminosäuren in P1-, P1'- und P2'-Position. B) Dargestellt sind die Progresskurven der mittels 1C11 katalysierten Hydrolysereaktionen für die Substrate R₁-YRH-R₂ (Violett) und R₁-LRH-R₂ (Türkis) sowie die aus den entsprechenden linearen Regressionen resultierenden Funktionen (gestrichelte Linien). Reaktionsbedingungen: 2-4 μM 1C11 bzw. 4F8, 1 mM Bz-AAX_{P1}X_{P1'}X_{P2}AAG-OH, 100 μM ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. R₁ = Bz-AA, R₂ = AAG-OH. Alle gezeigten Datenpunkte resultieren aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen. Die jeweiligen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Um diesem Umstand zu begegnen und aussagekräftigere Informationen zur präferierten Erkennungssequenz der Varianten 1C11 und 4F8, insbesondere im Hinblick auf die anwendungsrelevante Syntheseeffizienz, generieren zu können, wurden zusätzlich Transamidierungsstudien (siehe 3.6.1) unter Verwendung ausgewählter Substrat-Peptide durchgeführt. Neben R₁-YRH-R₂ (R₁ = Bz-AA, R₂ = AAG-OH), welches entsprechend die in der Selektion und Screening verwendete Erkennungssequenz enthielt, wurden die Peptide R₁-YKH-R₂, R₁-LRH-R₂, R₁-WRH-R₂ und R₁-FRH-R₂ ausgewählt, da die Varianten 1C11 und 4F8 für diese vier Peptide die höchsten Aktivitäten im Rahmen der Hydrolysestudien zeigten.

Die Ergebnisse der Transamidierungsstudien sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 zusammengefasst. Wie bereits im Zuge der primären Charakterisierung anhand von Transamidierungsstudien (siehe 4.4.3) beobachtet werden konnte,

korrelierten die Quotienten der apparenten Wechselzahlen (Aminolyse- durch Hydrolyseaktivität) mit den erreichten, maximalen Ausbeuten.

Tabelle 20: Analysen zur präferierten Erkennungssequenz der Variante 1C11 anhand von Transamidierungsstudien mit ausgewählten Substrat-Peptiden. Gezeigt sind die maximalen Ausbeuten der Transamidierung und apparenten Wechselzahlen der Aminolyse- und Hydrolyseaktivität für Variante 1C11 unter Verwendung ausgewählter Substrat-Peptide (Statistik siehe 3.9). Reaktionsbedingungen: 1-15 µM 1C11, 250 µM Bz-AAX_{P1}X_{P1}X_{P2}AAG-OH, 500 µM H-RHAK-OH bzw. H-KHAK-OH, 100 µM ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. AL = Aminolyse, HL = Hydrolyse

1C11	max. Ausbeute [%]	$k_{\text{cat app}} (\text{AL}) [\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{cat app}} (\text{HL}) [\text{s}^{-1}]$	$\frac{k_{\text{cat app}} (\text{AL})}{k_{\text{cat app}} (\text{HL})}$
Bz-AAYRHAAG-OH	61,8	0,0156	0,00025	61,7
Bz-AALRHAAG-OH	65,4	0,3211	0,00092	352,3
Bz-AAWRHAAG-OH	63,7	0,0279	0,00051	55,4
Bz-AAYKHAAG-OH	62,5	0,0485	0,00096	50,5
Bz-AAFRHAAG-OH	56,6	0,0236	0,00139	17,0

Tabelle 21: Analysen zur präferierten Erkennungssequenz der Variante 4F8 anhand von Transamidierungsstudien mit ausgewählten Substrat-Peptiden. Gezeigt sind die maximalen Ausbeuten der Transamidierung und apparenten Wechselzahlen der Aminolyse- und Hydrolyseaktivität für Variante 4F8 unter Verwendung ausgewählter Substrat-Peptide (Statistik siehe 3.9). Reaktionsbedingungen: 1-15 µM 4F8, 250 µM Bz-AAX_{P1}X_{P1}X_{P2}AAG-OH, 500 µM H-RHAK-OH bzw. H-KHAK-OH, 100 µM ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. AL = Aminolyse, HL = Hydrolyse

4F8	max. Ausbeute [%]	$k_{\text{cat app}} (\text{AL}) [\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{cat app}} (\text{HL}) [\text{s}^{-1}]$	$\frac{k_{\text{cat app}} (\text{AL})}{k_{\text{cat app}} (\text{HL})}$
Bz-AAYRHAAG-OH	61,9	0,0114	0,00021	55,9
Bz-AALRHAAG-OH	65,6	0,3589	0,00097	371,4
Bz-AAWRHAAG-OH	64,6	0,0222	0,00022	102,5
Bz-AAYKHAAG-OH	63,2	0,0443	0,00074	60,2
Bz-AAFRHAAG-OH	55,4	0,0210	0,00159	13,3

Dabei konnte für das Substrat-Peptid R₁-LRH-R₂ und beide Varianten 1C11 und 4F8 der höchste Quotient mit 352,3 bzw. 371,4 bestimmt werden, welcher damit im Vergleich zur YRH-Erkennungssequenz um ca. Faktor 6-7 erhöht war. Das resultierte auch in einer erhöhten maximalen Ausbeute von 65,4 % (1C11) respektive 65,6 % (4F8), welche unter Verwendung der LRH-Erkennungssequenz

erreicht werden konnte und somit sehr nahe an der theoretisch erreichbaren, maximalen Ausbeute von 66,7 % lag. Der erhöhte Quotient ließ sich hier primär auf eine stark erhöhte Aminolyseaktivität zurückführen, welche im Vergleich mit dem Substrat R₁-YRH-R₂ um einen Faktor von ca. 20-30 gesteigert war, während die Hydrolyseaktivität nur um einen Faktor von 4-5 höher war. Für die beiden Substrate R₁-WRH-R₂ und R₁-YKH-R₂ wurden weitestgehend gleichbleibende bzw. im Falle der Variante 4F8 vergleichsweise leicht erhöhte Quotienten der apparenten Wechselzahlen bestimmt. Trotzdem konnten auch hier im Vergleich zur YRH-Erkennungssequenz erhöhte maximale Ausbeuten festgestellt werden. Lediglich für das Substrat R₁-FRH-R₂ wurden um den Faktor 4 niedrigere Quotienten bestimmt, was auch zu geringeren maximalen Ausbeuten führte.

Zusammenfassend stellte die Aminosäuresequenz LRH, insbesondere vom anwendungsorientierten Standpunkt her, die vielversprechendste Erkennungssequenz dar. Zum einen konnten unter Verwendung des Substrat-Peptides R₁-LRH-R₂ die höchsten Ausbeuten an Aminolyseprodukt für beide Trypsilicase-Varianten 1C11 und 4F8 detektiert werden. Zum anderen wurden hier die – im Vergleich mit allen anderen in dieser Arbeit vermessenen Trypsilicase-Varianten bzw. Substrat-Peptiden – mit Abstand höchsten apparenten Wechselzahlen der Aminolyseaktivität bestimmt, was in der praktischen Anwendung kürzere Reaktionszeiten oder den Einsatz geringerer Mengen des Biokatalysators erlaubt.

4.6 Detaillierte Charakterisierung der Variante 1C11

Da in den vorangegangenen Studien keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Varianten 1C11 und 4F8 festgestellt werden konnten, wurde für die weitergehende Charakterisierung nur Variante 1C11 betrachtet. Diese Charakterisierung bestand zunächst in der Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat}. Zudem sollte ein Syntheseprofil unter Verwendung der Variante 1C11 und den Erkennungssequenzen YRH und LRH bei variierenden Substrat- und Nukleophil-Konzentrationen aufgenommen werden, anhand dessen die Syntheseeffizienz der Variante im Vergleich mit Trypsilicase verdeutlicht werden sollte. Weiterhin wurde der Einfluss der Zinkionen-Konzentration und des pH-Wertes auf die mittels Variante 1C11 katalysierte Transamidierungsreaktion analysiert.

4.6.1 Bestimmung von K_M und k_{cat} für die Transamidierungsreaktion

Die detaillierte Charakterisierung der Variante 1C11 sah zunächst die Bestimmung der Parameter K_M und k_{cat} und den Vergleich mit der Trypsilicase vor. Da diese Parameter für die Trypsilicase bis dato lediglich anhand der Hydrolysereaktion unter Verwendung variierender Konzentration der Substrat-Peptide bestimmt wurden (Liebscher, Schöpfel, et al., 2014), was jedoch im Falle der Variante 1C11, wie bereits unter 4.5 dargelegt, eine ungeeignete Vorgehensweise darstellte, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Parameter K_M und k_{cat} für Trypsilicase anhand der Transamidierungsreaktion ermittelt. So war auch eine Vergleichbarkeit der Parameter zwischen Trypsilicase und der Variante 1C11 gegeben.

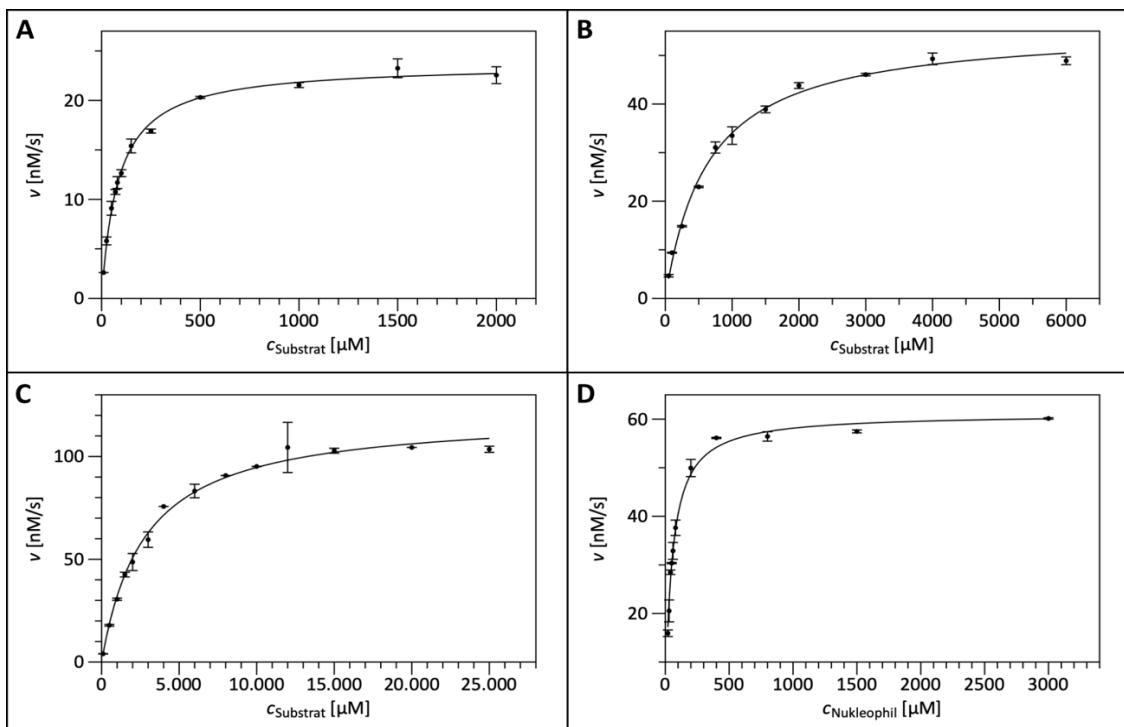


Abbildung 12: Bestimmung von K_M und k_{cat} für Trypsilicase und Variante 1C11. Es sind jeweils die Reaktionsgeschwindigkeiten der initialen Bildung des Aminolyseproduktes gegen die eingesetzte Substrat- bzw. Nukleophil-Konzentration aufgetragen. Alle gezeigten Datenpunkte resultieren aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen. Die jeweiligen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. A) Variante 1C11 mit variierender Konzentration des Substrat-Peptides R₁-YRH-R₂. Reaktionsbedingungen: 1 μ M 1C11, 10-2000 μ M R₁-YRH-R₂, 10 mM H-RHAK-OH, 100 μ M ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. B) Variante 1C11 mit variierender Konzentration des Substrat-Peptides R₁-LRH-R₂. Reaktionsbedingungen: 0,1 μ M 1C11, 50-6000 μ M R₁-LRH-R₂, 10 mM H-RHAK-OH, 100 μ M ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. C) Trypsilicase mit variierender Konzentration des Substrat-Peptides R₁-YRH-R₂. Reaktionsbedingungen: 0,3 μ M Trypsilicase, 100-25000 μ M R₁-YRH-R₂, 10 mM H-RHAK-OH, 100 μ M ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. D) Variante 1C11 mit variierender Konzentration des Nukleophil-Peptides H-RHAK-OH. Reaktionsbedingungen: 0,1 μ M 1C11, 6 mM R₁-LRH-R₂, 20-6000 μ M H-RHAK-OH, 100 μ M ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. R₁ = Bz-AA, R₂ = AAG-OH.

Die entsprechende Durchführung ist unter 3.6.3 detailliert beschrieben. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden gegen die jeweilige Substrat- bzw. Nukleophil-Konzentration aufgetragen (Abbildung 12). Mittels nicht-linearer Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung wurden aus diesen Diagrammen die Parameter K_M und v_{max} bestimmt. Die Wechselzahl k_{cat} wurde daraufhin durch Division von v_{max} mit der jeweiligen Enzymkonzentration berechnet.

In Tabelle 22 sind die so bestimmten Parameter zusammengefasst dargestellt. Zusätzlich wurde der Quotient aus der Wechselzahl k_{cat} und der Michaelis-Menten-Konstante K_M als Maß für die katalytische Effizienz berechnet. Aus diesen Daten wurde ersichtlich, dass im Zuge der Optimierung der Trypsilicase anhand des semi-rationalen Enzym-Designs der K_M -Wert für das Substrat Bz-AAYRHAAG-OH von 2763,3 µM (Trypsilicase) auf 84,1 µM (1C11) gesenkt werden konnte. Gleichzeitig verringerte sich jedoch auch die Wechselzahl von 0,403 s⁻¹ (Trypsilicase) auf 0,024 s⁻¹ (1C11). Nichtsdestotrotz zeigte die Variante 1C11 einen um Faktor 2 erhöhten Quotienten aus k_{cat} durch K_M , was die Verbesserung der Trypsilicase als Biokatalysator bestätigte. Bei Verwendung des Substrat-Peptides Bz-AALRHAAG-OH verbesserte sich dieser Quotient zusätzlich um den Faktor 3, was primär auf die stark erhöhte Wechselzahl von 0,559 s⁻¹ zurückzuführen war, während der K_M -Wert auf 639,6 µM erhöht wurde.

Tabelle 22: Zusammenfassung der enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} für Trypsilicase und Variante 1C11. Die Parameter wurden anhand von nicht-linearen Regressionen nach der Michaelis-Menten-Gleichung aus den in Abbildung 12A-C gezeigten Diagrammen bestimmt. Die angegebenen Werte resultieren aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen, während sich die Fehler aus den jeweiligen Standardabweichungen ergeben (siehe auch 3.9).

Enzym	Substrat	K_M [µM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
Trypsilicase 1C11	Bz-AAYRHAAG-OH	2763,3 ±48,6	0,403 ±0,005	145,8 ±4,4
	Bz-AAYRHAAG-OH	84,1 ±8,8	0,024 ±0,0002	285,4 ±32,2
	Bz-AALRHAAG-OH	639,6 ±9,9	0,559 ±0,008	874,0 ±26,0

Die Parameter K_M und k_{cat} wurden zusätzlich auch für die Variante 1C11 bei variierender Konzentration des Nukleophil-Peptides und unter Verwendung des Substrat-Peptides Bz-AALRHAAG-OH in Sättigung bestimmt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Hier wurde ein K_M -Wert für das

Nukleophil von $51 \mu\text{M}$ ermittelt, während die Wechselzahl mit $0,611 \text{ s}^{-1}$ erwartungsgemäß im Bereich der Wechselzahl bei variierender Konzentration des Substrat-Peptides ($0,559 \text{ s}^{-1}$) lag.

Tabelle 23: Zusammenfassung der enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} für Variante 1C11 bei variierender Nukleophil-Konzentration. Die Parameter wurden anhand einer nicht-linearen Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung aus dem in Abbildung 12D gezeigten Diagramm bestimmt. Die angegebenen Werte resultieren aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen, während sich die Fehler aus den jeweiligen Standardabweichungen ergeben (siehe auch 3.9).

Substrat	Nukleophil	$K_M [\mu\text{M}]$	$k_{\text{cat}} [\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{cat}}/K_M [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$
Bz-AALRHAAG-OH	H-RHAK-OH	$51,0 \pm 1,0$	$0,611 \pm 0,003$	$11980,4 \pm 293,5$

4.6.2 Studien zur Syntheseeffizienz der Variante 1C11

Im Rahmen der Promotionsarbeit von Herrn Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)) wurde ein grafisches Auswerteverfahren etabliert, um die Syntheseeffizienz von Trypsiligrase und Varianten derer – insbesondere in einem anwendungsorientierten Kontext – beurteilen und vergleichen zu können. Diese Syntheseprofile genannten Darstellungen veranschaulichen deutlich die Abhängigkeit der maximalen Ausbeute an Aminolyseprodukt sowohl von der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Substrat-Peptides als auch von dem molaren Überschuss des Nukleophil-Peptides.

Zur Generierung der Syntheseprofile für die Trypsiligrase-Variante 1C11 unter Verwendung der Substrat-Peptide Bz-AAYRHAAG-OH und Bz-AALRHAAG-OH wurden Transamidierungsstudien wie unter 3.6.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden 15 bzw. $250 \mu\text{M}$ Substrat und 2, 5, 10 oder 20 molare Äquivalente des Nukleophil-Peptides H-RHAK-OH eingesetzt. Es wurden jeweils die maximalen Ausbeuten an Aminolyseprodukt bestimmt und gegen die eingesetzten Äquivalente an Nukleophil in einem Diagramm aufgetragen. Zwischen den so generierten Kurvenverläufen für die hohe und niedrige Substratkonzentrationen ergaben sich jeweils Flächen, welche das Syntheseprofil repräsentierten.

Diese Syntheseprofile für Variante 1C11 sind in Abbildung 13 im Vergleich mit dem Syntheseprofil von Trypsiligrase mit dem Substrat-Peptid Bz-AAYRHAAG-OH dargestellt. Zudem sind hier die thermodynamisch maximal möglichen Ausbeuten in Abhängigkeit vom eingesetzten Überschuss an Nukleophil als rot gestrichelte

Linie dargestellt, welche sich ergeben würde, wenn die Hydrolyse als Konkurrenzreaktion zur Deacylierung mittels Aminolyse ausgeschlossen wäre.

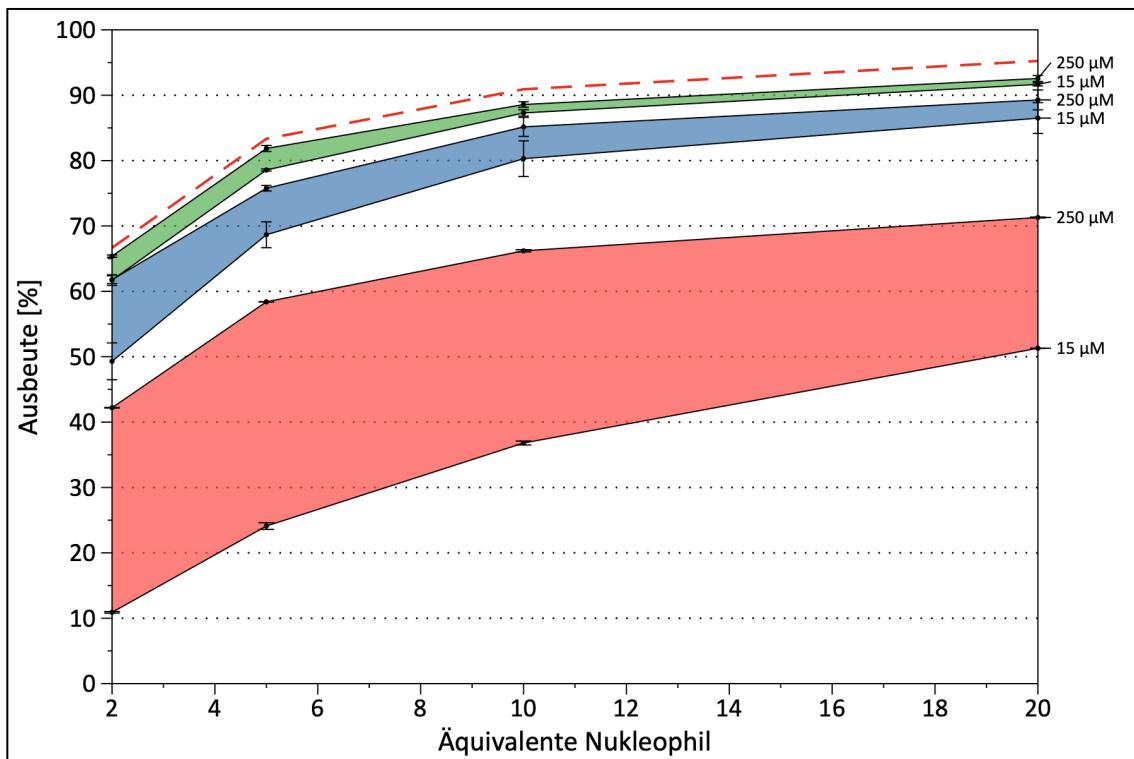


Abbildung 13: Syntheseprofile von Trypsilicase und Variante 1C11 im Vergleich. Die grafische Darstellung zeigt die maximalen Ausbeuten an Aminolyseprodukt bei 15 bzw. 250 µM Substrat-Peptid, welche gegen den jeweils eingesetzten molaren Überschuss an Nukleophil-Peptid von 2-20-fach aufgetragen wurden. Gezeigt sind die Syntheseprofile für Trypsilicase in Kombination mit dem Substrat-Peptid R₁-YRH-R₂ (Rot, Böhme, 2021), Variante 1C11 mit R₁-YRH-R₂ (Blau) und Variante 1C11 mit R₁-LRH-R₂ (Grün). Die rot gestrichelte Linie repräsentiert die thermodynamisch maximal möglichen Produktausbeuten bei dem jeweiligen Überschuss an Nukleophil-Peptid. Reaktionsbedingungen: 0,1-15 µM Trypsilicase/1C11, 15/250 µM R₁-YRH-R₂/R₁-LRH-R₂, 30-5000 µM H-RHAK-OH, 100 µM ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. R₁ = Bz-AA, R₂ = AAG-OH. Alle gezeigten Datenpunkte resultieren aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen. Die jeweiligen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Variante 1C11 zeigte hier unter allen angewendeten Reaktionsbedingungen deutlich höhere Produktausbeuten als die Trypsilicase. Insbesondere beim Einsatz niedriger Substratkonzentrationen von 15 µM konnten die Ausbeuten und damit die Syntheseeffizienz deutlich gesteigert werden, was auch in einer geringeren Differenz der erreichten Produktausbeuten zwischen niedrigen und hohen Substratkonzentrationen resultierte. Weiterhin demonstrierten diese Syntheseprofile deutlich die hohe Syntheseeffizienz der Kombination aus Variante 1C11 und dem Substrat-Peptid Bz-AALRHAAG-OH (Grün). Die hier erreichten Ausbeuten lagen sehr nahe am thermodynamisch möglichen Maximum. Zudem war die Differenz in der erreichten Ausbeute zwischen niedriger und hoher eingesetzter

Substratkonzentration vergleichsweise gering. So wurden z.B. bei 250 μM Substrat und einem 2-fachen Überschuss an Nukleophil 65,4 % Aminolyseprodukt erreicht, während bei 15 μM Substrat und gleichem Nukleophil-Überschuss 61,7 % erzielt wurden, was einer Differenz von 3,7 % entsprach. Diese Differenz wurde mit zunehmendem Überschuss an Nukleophil noch geringer (Differenz bei 20-fachem Überschuss entsprach 0,9 %). Die Trypsilicase erreichte bei 250 μM Substrat und einem 2-fachen Überschuss an Nukleophil lediglich 42,2 % bzw. 10,9 % bei einer Substratkonzentration von 15 μM . Somit konnte die gesteigerte Syntheseeffizienz der Variante 1C11 im Vergleich zur Trypsilicase anhand dieser Syntheseprofile anschaulich dargelegt werden.

4.6.3 Einfluss der Zinkionen-Konzentration auf die Transamidierung

Für die Kombination aus der Trypsilicase-Variante 1C11 mit dem Substrat-Peptid Bz-AALRHAAG-OH, welche in den vorrangegangenen Untersuchungen das höchste synthetische Potential aufwies, wurde der Einfluss der Zinkionen-Konzentration auf die Aminolyseaktivität untersucht.

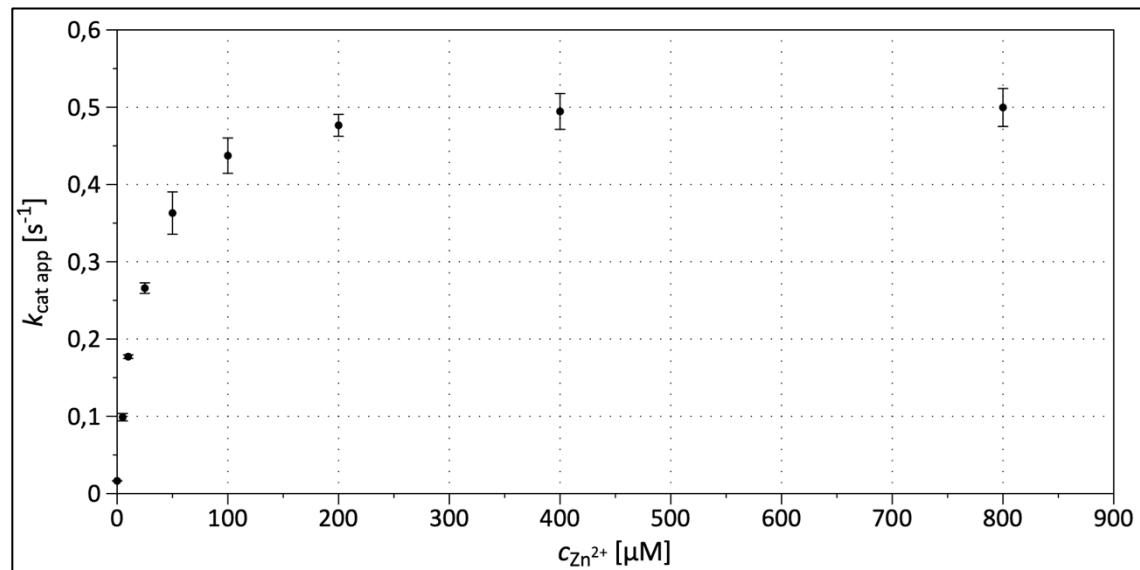


Abbildung 14: Aminolyseaktivität der Trypsilicase-Variante 1C11 in Abhängigkeit von der Zinkionen-Konzentration. Das Diagramm zeigt die apparenten Wechselzahlen der Aminolyse, welche gegen die jeweils eingesetzte Konzentration an Zink-Ionen aufgetragen wurden. Zur Ermittlung der apparenten Wechselzahlen wurde jeweils die initiale Aminolysegeschwindigkeit unter Verwendung des Substrat-Peptides Bz-AALRHAAG-OH bestimmt und mit der Enzymkonzentration dividiert. Reaktionsbedingungen: 0,5 μM 1C11, 600 μM Bz-AALRHAAG-OH, 1200 μM H-RHAK-OH, 0-800 μM ZnCl_2 in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. Alle gezeigten Datenpunkte resultieren aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen. Die jeweiligen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Hierzu wurden Transamidierungsstudien, wie unter 3.6.4 beschrieben, durchgeführt, wobei die Konzentration an Zink-Ionen von 0-800 µM variiert wurde. Im Zuge dessen wurden die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten der Bildung des Aminolyseproduktes bestimmt und durch Division mit der eingesetzten Enzymkonzentration die apparenten Wechselzahlen berechnet.

Anhand der Auftragung der ermittelten apparenten Wechselzahlen gegen die jeweilige Zinkionen-Konzentration (Abbildung 14) wurde ersichtlich, dass die Aminolyseaktivität mit steigender Konzentration an Zink-Ionen zunahm. Während die apparente Wechselzahl ohne hinzugefügtes Zinkchlorid nur bei $0,016\text{ s}^{-1}$ lag, wurde bei einer Konzentration von 800 µM Zinkchlorid ein Maximum von $0,500\text{ s}^{-1}$ erreicht, was einer Erhöhung um den Faktor 31 entsprach. Bei einer Zinkionen-Konzentration von 100 µM, welche üblicher Weise im Rahmen aller anderen in dieser Arbeit aufgeführten Experimente verwendet wurde, konnte eine apparente Wechselzahl von $0,437\text{ s}^{-1}$ ermittelt werden. Dieser Wert war somit 12,6 % niedriger als der höchste ermittelte Wert bei 800 µM Zinkchlorid.

4.6.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Transamidierung

Der pH-Wert stellte neben der Zinkionen-Konzentration einen weiteren prozess-relevanten Faktor dar, welcher somit für die praktische Anwendung der Trypsilinase-Variante 1C11 von Bedeutung war. Dementsprechend wurde auch der Einfluss des pH-Wertes auf die mittels Variante 1C11 katalysierte Transamidierung untersucht, wobei wiederum das Substrat-Peptid Bz-AALRHAAG-OH verwendet wurde. Wie unter 3.6.5 beschrieben, wurden Transamidierungsstudien bei einem von 6,6-8,4 variierenden pH-Wert durchgeführt. Es wurden jeweils die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten für die Bildung des Aminolyse- und Hydrolyseproduktes bestimmt. Aus diesen Werten wurden die apparenten Wechselzahlen mittels Division durch die Enzymkonzentration berechnet. Zudem wurde die maximal erreichte Ausbeute an Aminolyseprodukt bei dem jeweiligen pH-Wert bestimmt. Aus der Auftragung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyseaktivität gegen den jeweiligen pH-Wert (Abbildung 15A) wurde ersichtlich, dass diese mit sinkendem pH-Wert zunahm und bei einem pH-Wert von 6,6 mit $0,4479\text{ s}^{-1}$ das Maximum erreichte. Dahingegen blieben die apparenten Wechselzahlen der

Hydrolyseaktivität (Abbildung 15B) über den pH-Bereich weitestgehend konstant. Ab einem pH-Wert von 8,0 stiegen diese leicht und erreichten bei 8,2 ein Maximum von $0,0008 \text{ s}^{-1}$. Daraus resultierte auch, dass die Quotienten der apparenten Wechselzahlen von Aminolyse- durch Hydrolyseaktivität (Abbildung 15C) im pH-Bereich von 8,0-8,4 um den Faktor 1,5-2,4 niedriger waren, als im pH-Bereich von 6,6-7,8. Mit 777,8 lag der höchste Quotient hier bei einem pH-Wert von 7,0. Trotz der deutlichen Abhängigkeit des Quotienten vom pH-Wert blieben die ermittelten maximalen Ausbeuten an Aminolyseprodukt (Abbildung 15D) aber über den gesamten pH-Bereich sehr konstant. So wurde mit 64,4 % die niedrigste maximale Ausbeute bei einem pH-Wert von 8,4 bestimmt, während mit 66,4 % die höchste maximale Ausbeute bei einem pH-Wert von 6,8 gemessen wurde.

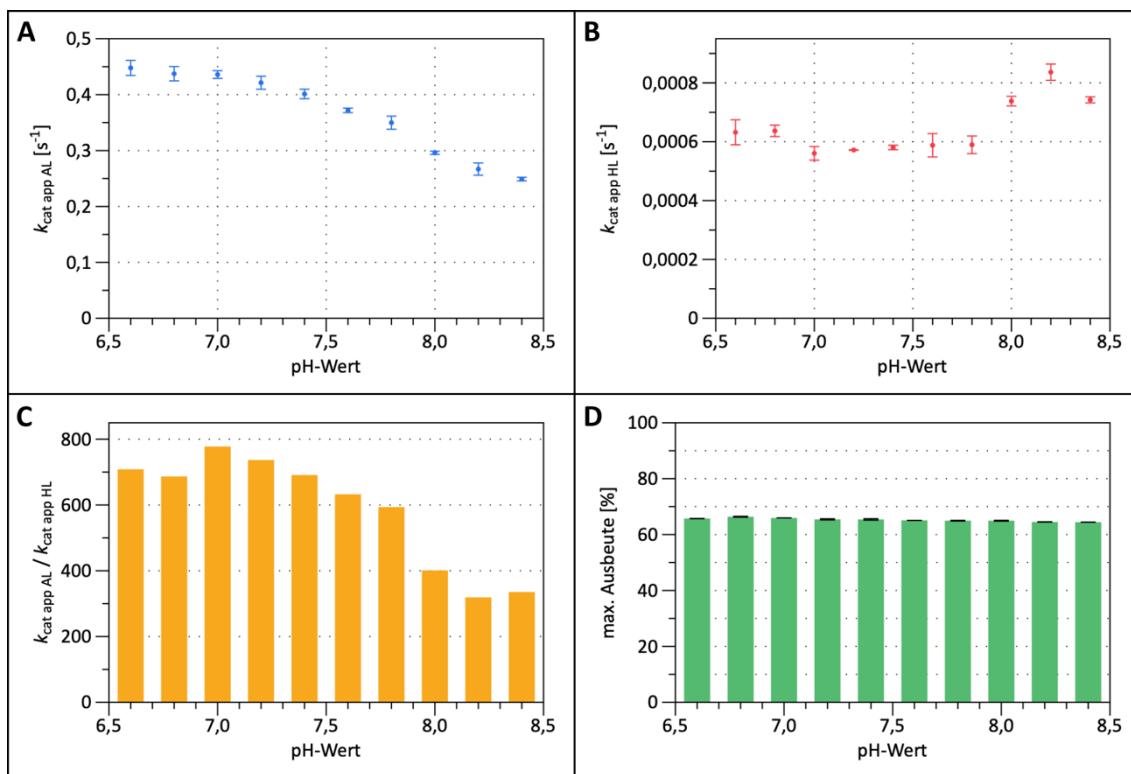


Abbildung 15: Transamidierungsstudien unter Verwendung der Trypsilase-Variante 1C11 bei variierendem pH-Wert. Die Diagramme zeigen die apparenten Wechselzahlen der Aminolyse (A), die apparenten Wechselzahlen der Hydrolyse (B), die Quotienten aus den apparenten Wechselzahlen von Aminolyse durch Hydrolyse (C) und die erreichten maximalen Ausbeuten an Aminolyseprodukt (D) welche gegen den jeweils angewendeten pH-Wert aufgetragen wurden. Zur Ermittlung der apparenten Wechselzahlen wurde jeweils die initiale Reaktionsgeschwindigkeit unter Verwendung des Substrat-Peptides Bz-AALRHAAG-OH bestimmt und mit der Enzymkonzentration dividiert. Reaktionsbedingungen: 0,5-2 μM 1C11, 600 μM Bz-AALRHAAG-OH, 1200 μM H-RHAK-OH, 100 μM ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9) mit pH 6,6-8,4 bei 30 °C unter Schütteln. Alle gezeigten Datenpunkte resultieren aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen. Die jeweiligen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Zusammenfassend ließ sich anhand dieser Untersuchungen verdeutlichen, dass für die Kombination aus Variante 1C11 mit dem Substrat-Peptid Bz-AALRHAAG-OH ein breiter pH-Bereich anwendbar ist, ohne dass die enzymatische Aktivität oder die erreichbare Ausbeute an Aminolyseprodukt ausschlaggebend beeinträchtigt wird.

4.7 Modifikation des α Her2-Fab-Fragments mittels 1C11

Das Ziel der Optimierung der Trypsiligase anhand eines semi-rationalen Enzym-Designs bestand primär darin, einen effizienten Biokatalysator für die ortspezifische Modifikation von Proteinen bereitstellen zu können. Dementsprechend sollte auch das synthetische Potential der Variante 1C11 anhand eines praxisnahen Anwendungsbeispiels eruiert werden. Zu diesem Zweck sollte das Fab-Fragment des Her2/neu-spezifischen Antikörpers Trastuzumab mit einer C-terminalen YRH- bzw. LRH-Erkennungssequenz unter Verwendung der Variante 1C11 modifiziert werden. Für die Modifikation sollten zudem die Nukleophil-Peptide H-RHAK(FAM)-OH, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluorescein konjugiert war, und H-RHAK(MCC-DM1)-OH, welches über einen Maleimidomethylcyclohexan-1-carboxylat (MCC)-Linker mit dem Maytansinoid DM1 konjugiert war, verwendet werden. Hierfür mussten die Fab-Fragmente mit C-terminaler Erkennungssequenz zunächst mittels rekombinanter Biosynthese in *E. coli* hergestellt und anschließend chromatografisch gereinigt werden. Daraufhin erfolgte die enzymatische Modifikation der Fab-Fragmente unter Verwendung der Variante 1C11, wobei der Reaktionsverlauf mittels Umkehrphasen-UPLC analysiert wurde. Zudem sollte die Funktionalität der mit DM1 modifizierten Fab-Fragmente mittels ELISA überprüft werden.

4.7.1 Biosynthese und Reinigung der Fab-Fragmente

Im Zuge dieser Arbeit sollten die Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc und α Her2-Fab-TAALRH-cmyc für eine enzymatische Modifikation mittels Variante 1C11 verwendet werden. Beide Fab-Fragmente waren dabei am C-Terminus der schweren Kette um die Aminosäuresequenz H-TAAY/LRHAAGEQKLISEEDL-OH verlängert. Während die Herstellung und Reinigung des in dieser Arbeit verwendeten Fab-Fragments α Her2-Fab-TAALRH-cmyc im Zuge der Masterarbeit von

Frau Julia Simon (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Simon, 2018)) durchgeführt wurde, erfolgte die Herstellung und Reinigung des Fab-Fragments α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc im Rahmen dieser Arbeit nach identischem Protokoll und wie im Folgenden beschrieben.

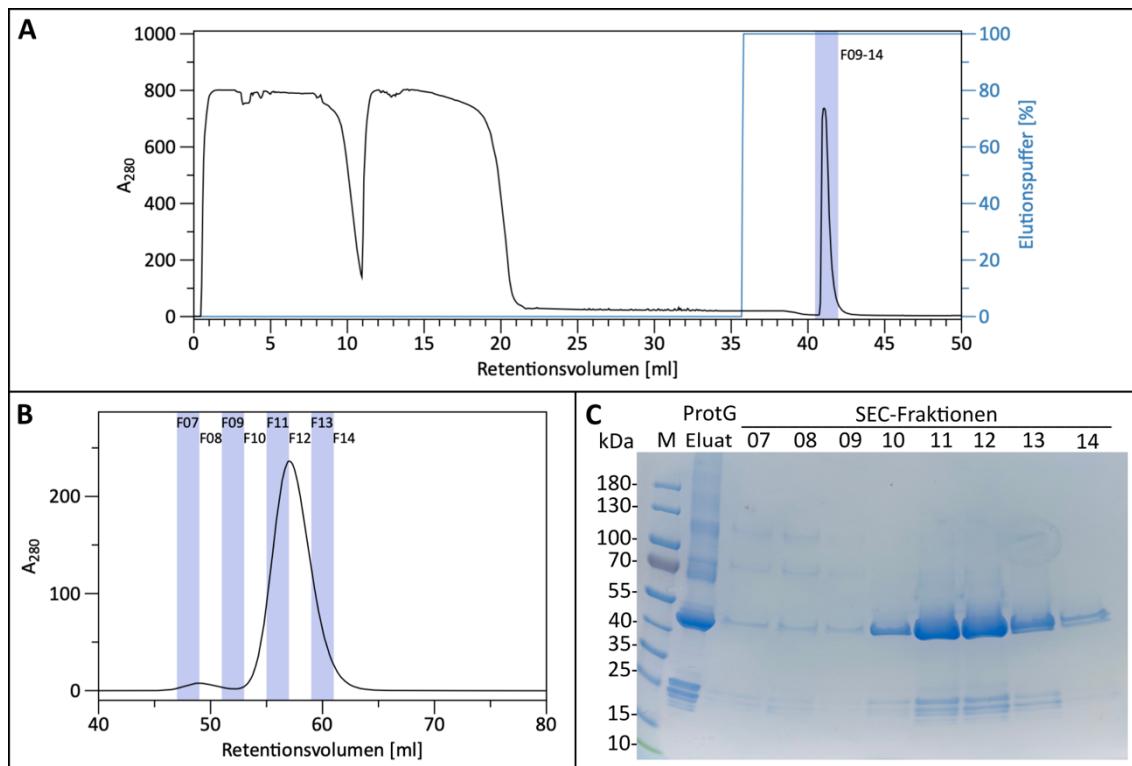


Abbildung 16: Chromatografische Reinigung des Fab-Fragments α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc. A) Dargestellt ist das Chromatogramm der Protein G-Affinitätschromatografie zur Isolierung des Fab-Fragments aus dem Zelllysat. Die blau gekennzeichneten Fraktionen wurden vereinigt und für die nachfolgende Größenausschluss-Chromatografie eingesetzt. B) Gezeigt ist das Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatografie von α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc. Die mittels SDS-PAGE analysierten Fraktionen sind entsprechend gekennzeichnet. Die Fraktionen 10-12 wurden vereinigt und konzentriert. C) Analyse der vereinigten Fraktionen der Protein G-Affinitätschromatografie (ProtG Eluat) sowie ausgewählter Fraktionen der Größenausschluss-Chromatografie (SEC) mittels SDS-PAGE. Jeweils 20 μ l Probe wurden mit 6 μ l 3x SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte mittels Coomassie-Färbung. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa

Zunächst wurde die rekombinante Biosynthese des Fab-Fragments, wie unter 3.2.2 beschrieben durchgeführt. Das resultierende Zellpellet wurde anschließend für die chromatografische Reinigung eingesetzt (siehe 3.3.1). Entsprechend dem Chromatogramm der Protein G-Affinitätschromatografie (Abbildung 16A) wurden die Fraktionen mit einem Retentionsvolumen von 40,5-42 ml vereinigt. Im Chromatogramm der anschließenden Größenausschluss-Chromatografie (Abbildung 16B) zeigten sich zwei Peaks bei Retentionsvolumina von 47-53 ml bzw. 53-63 ml. Zur Identifikation der korrekten Spezies des Fab-Fragmentes α Her2-Fab-TAAYRH-

cmyc und zur Überprüfung der Reinheit wurde das Eluat der Protein G-Affinitätschromatografie sowie die Fraktion 7-14 der Größenausschluss-Chromatografie mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen analysiert (siehe 3.3.4; Abbildung 16C). Hier konnte in allen Proben eine Proteinbande bei ca. 50 kDa detektiert werden, was dem Molekulargewicht des Fab-Fragmentes entsprach. In den SEC-Fraktionen 7-9 zeigten sich zudem Banden bei höheren Molekulargewichten zwischen 70-130 kDa. Laut Herstellerangaben zu der verwendeten Hi-Load 16/600 Superdex 75 pg Säule wies hier ein Retentionsvolumen dieser Fraktionen von 47-53 ml ebenfalls auf Proteinspezies mit Molekulargewichten von über 100 kDa hin, weswegen hier von oligomeren Spezies ausgegangen werden konnte. In den Fraktionen 13 und 14 zeigten sich zudem Proteinbanden knapp unterhalb der Banden bei 50 kDa, was auf Abbauprodukte des Fab-Fragmentes hinwies. Dementsprechend wurden die Fraktionen 10-12 vereinigt und konzentriert.

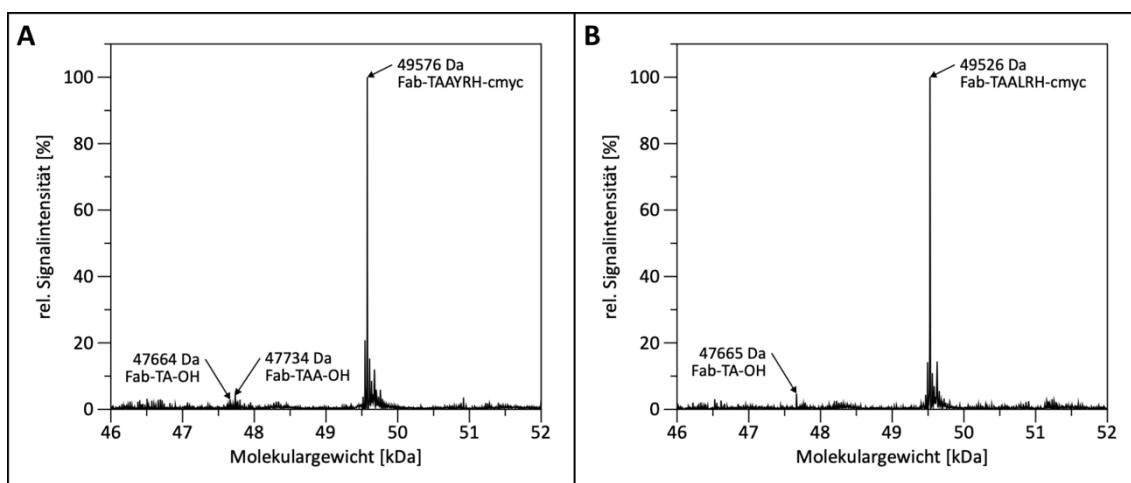


Abbildung 17: LC/MS-Analytik der gereinigten Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc und α Her2-Fab-TAALRH-cmyc. Die Analyse mittels LC/MS erfolgte jeweils nach Aufreinigung mittels Größenausschluss-Chromatografie und anschließendem Konzentrieren. A) α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc: $M_{ber.} = 49580,4$ Da, $M_{gem.} = 49576$ Da; α Her2-Fab-TAA-OH: $M_{ber.} = 47739,4$ Da, $M_{gem.} = 47734$ Da; α Her2-Fab-TA-OH: $M_{ber.} = 47668,3$ Da, $M_{gem.} = 47664$ Da; B) α Her2-Fab-TAALRH-cmyc: $M_{ber.} = 49530,3$ Da, $M_{gem.} = 49526$ Da; α Her2-Fab-TA-OH: $M_{ber.} = 47668,3$ Da, $M_{gem.} = 47664$ Da

Vor der Verwendung beider Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc und α Her2-Fab-TAALRH-cmyc für die enzymatische Modifikation wurde zusätzlich eine LC/MS-Analytik (siehe 3.3.5; Abbildung 17) durchgeführt, um die Identität zu bestätigen und die Reinheit näher untersuchen zu können. Mit einer Abweichung von nur 4 Da von dem berechneten Molekulargewicht konnten beide Fab-Fragmente eindeutig identifiziert werden. Jedoch konnten in beiden

Präparationen auch proteolytische Abbauprodukte der Fab-Fragmente detektiert werden, deren gemessene Molekulargewichte mit 47734 Da bzw. 47664 Da den Konstrukten α Her2-Fab-TAA-OH bzw. α Her2-Fab-TA-OH entsprachen. Die prozentualen Anteile dieser Abbauprodukte lagen jedoch in allen Fällen unter 5 % und waren damit vernachlässigbar klein, sodass diese Präparationen für die mittels Variante 1C11 katalysierte Modifikation eingesetzt werden konnten.

4.7.2 Transamidierungsstudien unter Verwendung der Fab-Fragmente

Unter Verwendung der generierten Fab-Fragmente mit YRH- bzw. LRH-Erkennungssequenz sollte nun die Syntheseeffizienz der Trypsilicase-Variante 1C11 anhand eines anwendungsorientierten Beispiels validiert werden. Dafür wurden, wie unter 3.7 beschrieben, Transamidierungsreaktionen angesetzt, wobei die beiden Fab-Fragmente und die Nukleophil-Peptide H-RHAK(FAM)-OH und H-RHAK(MCC-DM1)-OH zum Einsatz kamen. Die Kombination aus den Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmenten von Trastuzumab und dem Maytansinoid DM1 war dabei an das zugelassenen ADC Kadcyla® (Trastuzumab-Emtansin) angelehnt. Als Referenz wurden diese Studien zudem mit Trypsilicase und dem Fab-Fragment α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc durchgeführt. Durch Abnahme von Proben zu definierten Zeitpunkten und deren Analyse mittels Umkehrphasen-UPLC konnten jeweils die prozentualen Anteile an Aminolyseprodukt bestimmt werden, was für Modifikationen mit dem Nukleophil-Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH durchgeführt wurde. Aus der Auftragung der prozentualen Ausbeute gegen die Reaktionszeit resultierten die in Abbildung 18 gezeigten Progresskurven.

Anhand der Progresskurven konnte die deutlich gesteigerte maximale Ausbeute durch die Verwendung der Variante 1C11 für die Modifikation der Fab-Fragmente demonstriert werden. Unter den angewendeten Reaktionsbedingungen erreichte die Trypsilicase eine maximale Ausbeute von 38,1 % nach 20 min Reaktionszeit. Zudem sank die Ausbeute nach Erreichen des Maximums wieder stark und lag nach 90 min Reaktionszeit nur noch bei 10,0 %, was auf die Sekundärhydrolyse des Aminolyseproduktes zurückzuführen ist. Das entspricht einer Abnahme um einen Faktor von 3,82. Unter Verwendung der Variante 1C11 und dem Fab-Fragment α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc konnte eine maximale Ausbeute von 72,7 % nach

30 min Reaktionszeit erzielt werden. Hier sank die Ausbeute nach 90 min Reaktionszeit auf 62,9 % (Faktor 1,15). Die 1C11-katalysierte Modifikation des Fab-Fragments α Her2-Fab-TAALRH-cmyc führte zu einer weiteren Ausbeute-Steigerung auf 76,4 % nach 40 min Reaktionszeit. Zudem zeigte sich hier die geringste Abnahme der Ausbeute, verursacht durch Sekundärhydrolyse, welche um den Faktor 1,04 auf 73,8 % nach 90 min Reaktionszeit sank.

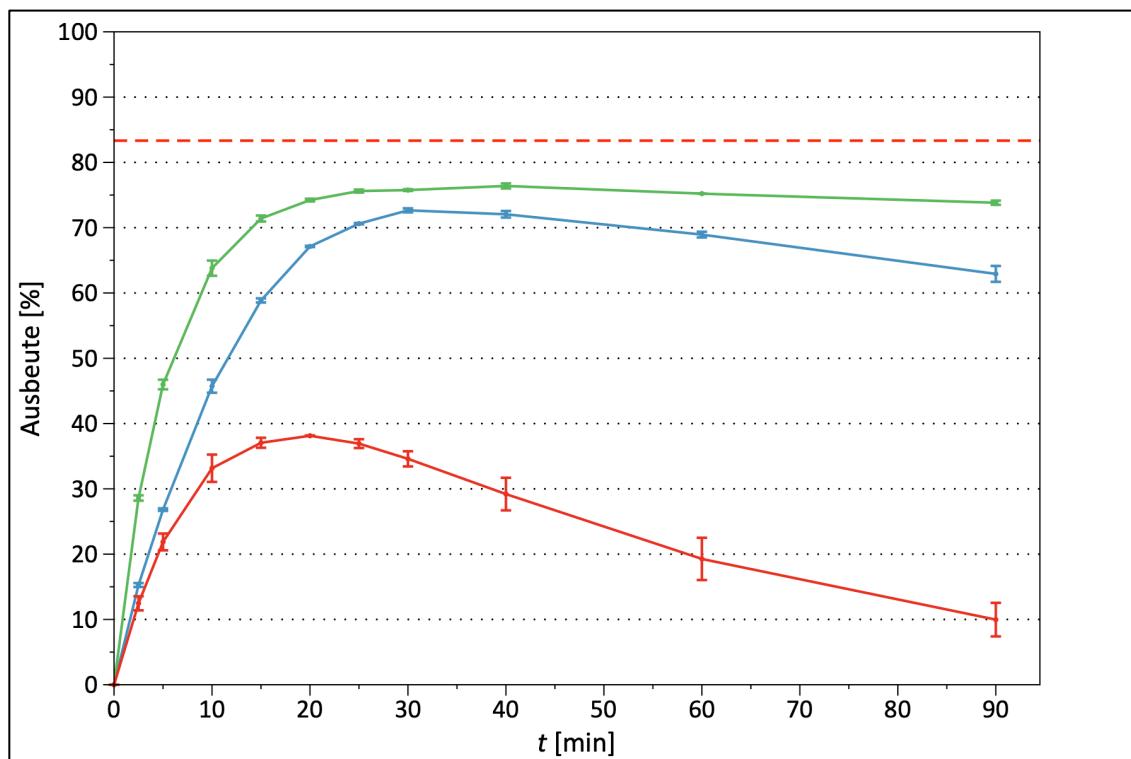


Abbildung 18: Progresskurven der Modifikation des Her2-spezifischen Fab-Fragments mittels Trypsilicase und 1C11. Aufgetragen sind die gemessenen Ausbeuten an Aminolyseprodukt gegen die Inkubationszeit. Gezeigt sind die Progresskurven der 1C11-katalysierten Modifikation der Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc (Blau) und α Her2-Fab-TAALRH-cmyc (Grün) sowie der Trypsilicase-katalysierten Modifikation von α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc (Rot) als Referenz. Es wurde jeweils das Nukleophil-Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH eingesetzt. Die rote gestrichelte Linie stellt die thermodynamisch maximal mögliche Produktausbeute aufgrund des eingesetzten, fünffachen Überschusses an Nukleophil-Peptid dar. Reaktionsbedingungen: 10 μ M Trypsilicase/1C11; 100 μ M α Her2-Fab-TAAY/LRH-cmyc; 500 μ M H-RHAK(MCC-DM1)-OH; 100 μ M ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln. Die Produktausbeuten wurden durch Umkehrphasen-UPLC und Detektion bei 280 nm bestimmt. Alle gezeigten Datenpunkte resultieren aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen. Die jeweiligen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Neben der quantitativen Analytik mittels Umkehrphasen-UPLC wurden von den 1C11-katalysierten Transamidierungsansätzen mit beiden Fab-Fragmenten und beiden verwendeten Nukleophil-Peptiden H-RHAK(FAM)-OH und H-RHAK(MCC-DM1)-OH auch Proben für eine LC/MS-Analytik (siehe 3.3.5) abgenommen, um auch qualitative Informationen zu den Reaktionsprodukten zu

erhalten. Die dekonvolutierten Spektren dieser Messungen sind in Abbildung 19 dargestellt.

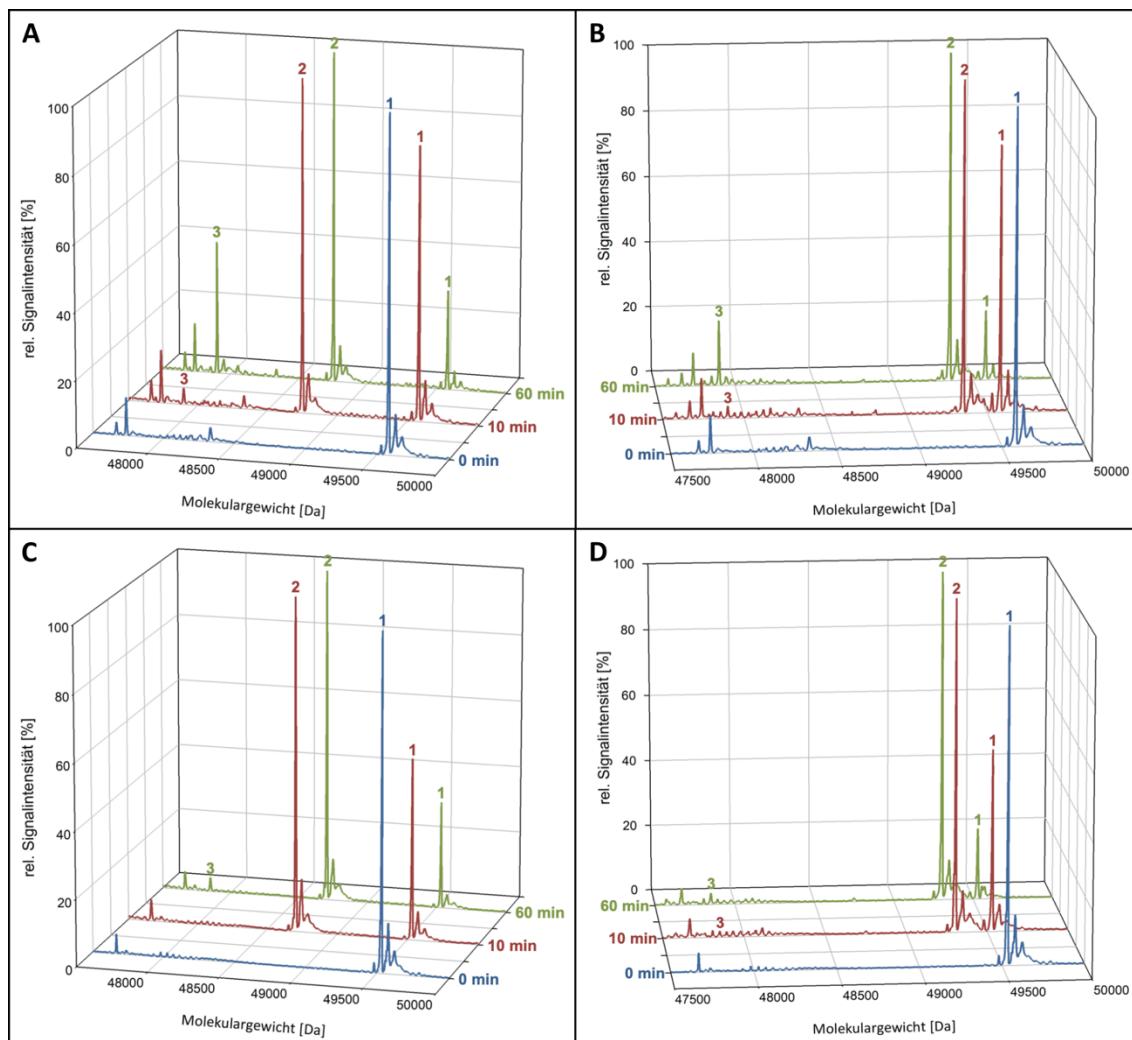


Abbildung 19: LC/MS-Analytik zum Reaktionsverlauf der Modifikation des Her2-spezifischen Fab-Fragmentes mittels 1C11. Dargestellt sind jeweils die dekonvolutierten Spektren der LC/MS-Messungen nach 0 min (Blau); 10 min (Rot) und 60 min (Grün) Reaktionszeit. A) Konjugation von H-RHAK(FAM)-OH an α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc mittels 1C11. B) Konjugation von H-RHAK(DM1)-OH an α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc mittels 1C11. C) Konjugation von H-RHAK(FAM)-OH an α Her2-Fab-TAALRH-cmyc mittels 1C11. D) Konjugation von H-RHAK(DM1)-OH an α Her2-Fab-TAALRH-cmyc mittels 1C11. Peak 1 (Edukt): α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc: $M_{ber.} = 49580,4$ Da, $M_{gem.} = 49580$ Da bzw. α Her2-Fab-TAALRH-cmyc: $M_{ber.} = 49530,3$ Da, $M_{gem.} = 49530$ Da; Peak 2 (Aminolyseprodukt): α Her2-Fab-TAAYRHAK(FAM)-OH: $M_{ber.} = 48753,4$ Da, $M_{gem.} = 48754$ Da bzw. α Her2-Fab-TAAYRHAK(DM1)-OH: $M_{ber.} = 49352,5$ Da, $M_{gem.} = 49352$ Da bzw. α Her2-Fab-TAALRHAK(FAM)-OH: $M_{ber.} = 48703,3$ Da, $M_{gem.} = 48705$ Da bzw. α Her2-Fab-TAALRHAK(DM1)-OH: $M_{ber.} = 49302,4$ Da, $M_{gem.} = 49302$ Da; Peak 3 (Hydrolyseprodukt): α Her2-Fab-TAAY-OH: $M_{ber.} = 47902,5$ Da, $M_{gem.} = 47902$ Da bzw. α Her2-Fab-TAAL-OH: $M_{ber.} = 47852,4$ Da, $M_{gem.} = 47851$ Da. Reaktionsbedingungen: 10 μ M 1C11; 100 μ M α Her2-Fab-TAAY/LRH-cmyc; 500 μ M H-RHAK(FAM)-OH/H-RHAK(MCC-DM1)-OH; 100 μ M ZnCl₂ in Puffer T (siehe 2.9); 30 °C unter Schütteln.

Neben den Edukten (Peak1) und den jeweils erwarteten Aminolyse- (Peak 2) und Hydrolyseprodukten (Peak 3) konnten hier anhand der LC/MS-Analytik keine

Nebenprodukte der Enzym-katalysierten Reaktion detektiert werden. Anhand der Massenspektren für die Modifikation des Fab-Fragmentes α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc nach 60 min Reaktionszeit (Abbildung 19A/B, Grün) konnten erhöhte relative Signalintensitäten für das Hydrolyseprodukt (Peak3) festgestellt werden. Im Vergleich dazu zeigten die Massenspektren nach 60 min Reaktionszeit unter Verwendung des Fab-Fragmentes α Her2-Fab-TAALRH-cmyc (Abbildung 19C/D, Grün) nur sehr geringe relative Signalintensitäten für das Hydrolyseprodukt.

4.7.3 Analyse der Funktionalität modifizierter Fab-Fragmente mittels ELISA

Ein wesentliches Kriterium in der Anwendung einer enzymatischen Technologie zur ortsspezifischen Modifikation eines Proteins (z.B. Antikörper oder Fab-Fragment) ist der Erhalt der Funktion des jeweiligen Proteins. Im Falle von Antikörpern oder Fab-Fragmenten ist dies die Bindungsaffinität für ein spezifisches Antigen. Dementsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Bindungsfunktionalität der mittels 1C11 modifizierten Fab-Fragmente analysiert, um die praktische Anwendbarkeit der Variante 1C11 zur ortsspezifischen Proteinmodifikation zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurden, wie unter 3.8 beschrieben, zunächst Transamidierungen unter Verwendung der Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc und α Her2-Fab-TAALRH-cmyc, des Nukleophil-Peptides H-RHAK(MCC-DM1)-OH und der Variante 1C11 angesetzt. Diese wurden nach 30 min Inkubation für einen konzentrationsabhängigen ELISA unter Verwendung der humanen Ektodomäne des Her2-Rezeptors eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden hier auch die nicht-modifizierten Fab-Fragmente mitgeführt. Die Auftragung der ermittelten Signalintensitäten gegen die Konzentrationen der Verdünnungsreihen als Ergebnis des ELISAs ist in Abbildung 20 zu sehen. Die anhand der Regressionen ermittelten Bindungsaffinitäten für die modifizierten Fab-Fragmente (K_D (α Her2-Fab-TAAYRHAK(DM1)-OH) = 207 pM; K_D (α Her2-Fab-TAALRHAK(DM1)-OH) = 341 pM) lagen dabei sehr nah an den erzielten Werten für die nicht-modifizierten Fab-Fragmente (K_D (α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc) = 226 pM; K_D (α Her2-Fab-TAALRH-cmyc) = 364 pM). Dementsprechend konnte anhand der Analytik mittels ELISA kein Einfluss der 1C11-katalysierten Modifikation auf die Bindungsfunktionalität der Fab-Fragmente festgestellt werden.

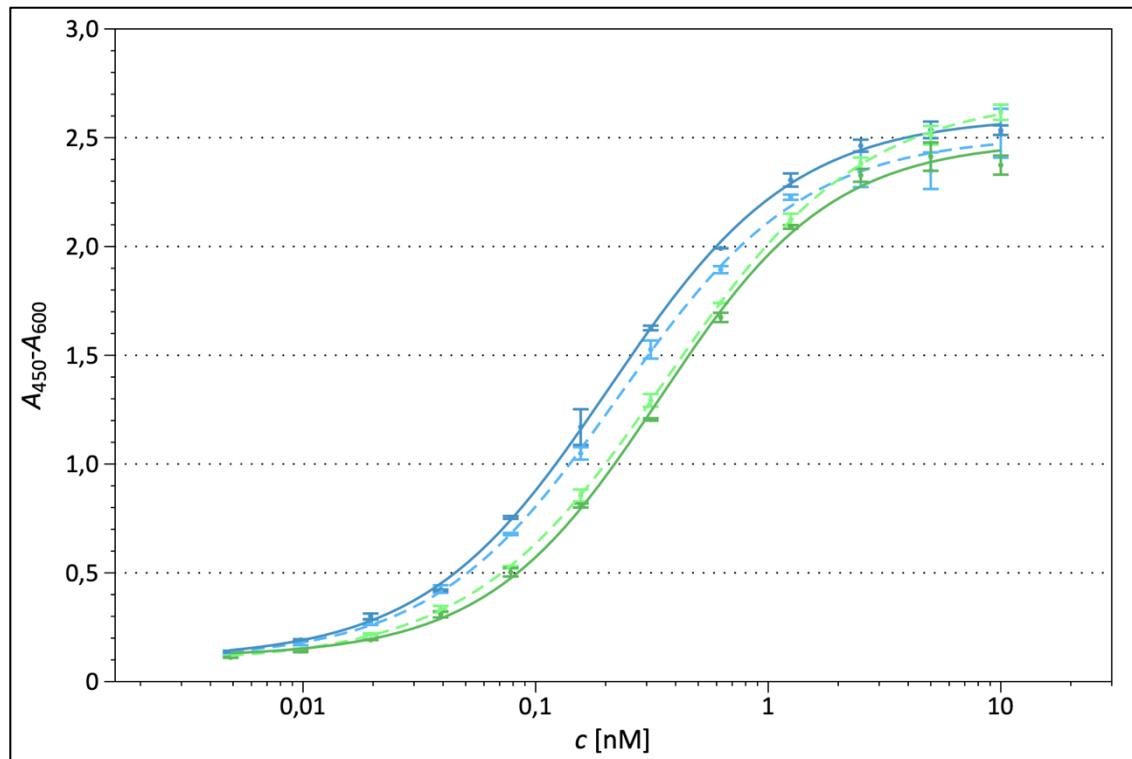


Abbildung 20: Analyse der Bindungsfunktionalität modifizierter Fab-Fragmente mittels ELISA. Dargestellt sind die korrigierten Signalintensitäten gegen die eingesetzte Konzentration der Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc (Hellblau, gestrichelte Linie), α Her2-Fab-TAAYR-HAK(DM1)-OH (Blau, durchgezogene Linie), α Her2-Fab-TAALRH-cmyc (Hellgrün, gestrichelte Linie) und α Her2-Fab-TAALRHAK(DM1)-OH (Grün, durchgezogene Linie) als Ergebnis des konzentrationsabhängigen ELISA. Mithilfe einer logistischen 4-Parameter-Regression wurden die folgenden K_D -Werte bestimmt: K_D (α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc) = 226 pM; K_D (α Her2-Fab-TAAYR-HAK(DM1)-OH) = 207 pM; K_D (α Her2-Fab-TAALRH-cmyc) = 364 pM; K_D (α Her2-Fab-TAALRHAK(DM1)-OH) = 341 pM. Alle dargestellten Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten unabhängiger 3-fach-Bestimmungen. Die jeweiligen Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Design und Qualität der Trypsiligase-basierten Bibliothek

Wie in Kapitel 1.2 bereits ausführlich dargelegt wurde, haben das Bibliotheksdesign und qualitative Kriterien, wie Funktionalität und Diversität der hergestellten Bibliothek, einen nachhaltigen Einfluss auf den Erfolg eines semi-rationalen Enzymdesigns. Der erste Schritt im Bibliotheksdesign stellt hier die Auswahl der zu randomisierenden Positionen dar. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Aminosäurepositionen D95, R96, L99, S214, G219 und A221 für eine Randomisierung ausgewählt. Die räumliche Anordnung dieser Positionen um das aktive Zentrum ist in Abbildung 5 (siehe Kapitel 4.1.1) dargestellt. Der Auswahl dieser Positionen lagen einige theoretische Ansätze oder Annahmen zugrunde, welche im Folgenden näher erläutert werden sollen.

Um das synthetische Potential der Trypsiligase in der Transamidierung zu verbessern, ist es entscheidend, das Verhältnis von Aminolyse- und Hydrolyseaktivität zu Gunsten der Aminolyse zu verschieben. Folgerichtig kann dieses Ziel erreicht werden, wenn die Hydrolyse- in Relation zur Aminolyseaktivität gesenkt wird, oder die Aminolyse- in Relation zur Hydrolyseaktivität erhöht wird. Ein möglicher Ansatz ist es also, in der Literatur beschriebene Aminosäurepositionen für die Randomisierungen auszuwählen, welche nachweislich einen Einfluss auf die Hydrolyseaktivität von Trypsin haben. Dabei sind die Positionen der katalytischen Triade bestehend aus Histidin 57, Aspartat 102 und Serin 195 ausgenommen, um die katalytische Aktivität generierter Trypsiligase-Varianten zu erhalten (Polgár, 2005). Basierend auf dieser Strategie wurde die Position S214 ausgewählt, da gezeigt werden konnte, dass Mutationen in dieser Position einen Einfluss auf die Hydrolyseaktivität von anionischem Ratten-Trypsin haben (McGrath et al., 1992). Serin 214 ist hoch konserviert und wird in der Literatur häufig als vierter Mitglied einer katalytischen Tetraden in Serinproteasen bezeichnet, da es über das Sauerstoff-Atom in der Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung zum Aspartat 102 der katalytischen Triade bildet (Krem, 2001; Yousef et al., 2004). Die Eliminierung der Hydroxy-Gruppe des Serins und damit der Wasserstoffbrückenbindung durch die Mutation S214A in Trypsin führt jedoch nicht zu einem Aktivitätsverlust bei

Verwendung des Substrates Succinyl-AFK-aminomethylcumarin, während die Mutation S214K die Hydrolyseaktivität für das selbe Amidsubstrat um einen Faktor von ca. 100 reduziert (McGrath et al., 1992). Somit birgt diese Aminosäureposition ein großes Potential für das hier angestrebte Ziel.

Ein weiterer Ansatz ist die Schaffung eines hydrophoben Milieus im aktiven Zentrum von Trypsiligase, um die Einbindung von Wassermolekülen zu erschweren und dadurch die Hydrolyseaktivität zu senken. Diese Hypothese wurde bereits im Zuge der Promotionsarbeit von Frau Dr. Sabrina Gissel (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Gissel, 2017)) formuliert und sollte auch in der hier vorliegenden Arbeit Anwendung finden. Dabei basierte diese Hypothese auf dem Vergleich der aktiven Zentren von Trypsiligase und Sortase A. Während die Bereiche um das aktive Zentrum der Trypsiligase weitestgehend hydrophil sind, sind diese Bereiche bei der Sortase A überwiegend hydrophob, was ursächlich für die geringe Hydrolyseaktivität der Sortase A sein könnte (Zong et al., 2004). In Anbetracht dieses theoretischen Ansatzes wurden die Positionen D95, R96, L99, G219 und A221 ausgewählt, wobei natürlich auch die Position S214 hier zuträglich sein kann.

Der dritte theoretische Ansatz bezieht sich auf die Geometrie des Acyl-Enzym-Intermediats und damit einhergehende Anforderungen an dessen Deacylierung. So ist für Serinproteasen beschrieben, dass die Positionierung des hydrolytisch aktiven Wassermoleküls im aktiven Zentrum entscheidend für die katalytische Aktivität ist. Dabei sind die Abstände des Wassermoleküls zu Histidin 57 (für Deprotonierung) und dem Carbonyl-C-Atom des Acyls ebenso wichtig wie die räumliche Anordnung des Wassermoleküls, wobei der Winkel des nukleophilen Angriffs ca. 109 ° betragen muss (Hedstrom, 2002). Anhand von Kristallstrukturen Trypsin-basierter Acyl-Enzym-Intermediate konnte auch gezeigt werden, dass Unterschiede in der Deacylierungsgeschwindigkeit mit der Koordinierung der Acyl-Gruppe und dem hydrolytischen Wassermolekül in Zusammenhang stehen (Radisky et al., 2006). Demzufolge könnten Mutationen in Aminosäurepositionen, welche potentiell mit den P1- und P2-Positionen des Acyldonors interagieren, eine Veränderung der Geometrie des Acyl-Enzym-Intermediats zur Folge haben, was wiederum Einfluss auf das Aminolyse-zu-Hydrolyse-Verhältnis haben kann. In diesem Kontext wurden die Positionen L99 und G219 ausgewählt.

Die Synthese der randomisierten Bibliothek erfolgte, wie in Kapitel 4.1.2 detailliert beschrieben, anhand eines modularen Bibliotheksdesigns unter Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen (Virnekäs et al., 1994) und einer Leserahmenselektion (Gerth et al., 2004). Diese beiden Komponenten waren bereits Teil der im Zuge der Promotionsarbeit von Herrn Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)) getroffenen Maßnahmen zur qualitativen Optimierung Trypsiligase-basierter Bibliotheken, wie unter 1.4 beschrieben. Die Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen sollte dabei garantieren, dass eine äquimolare Mischung exakt definierter Codone für die Randomisierung eingesetzt wird, was eine Häufung bestimmter Aminosäuren aufgrund der Redundanz des genetischen Codes und das Auftreten von Stoppcodonen an den randomisierten Positionen verhindern sollte (siehe auch Kapitel 1.2). Die Leserahmenselektion diente zudem der Reduzierung von *frameshift*-Mutationen, welche im Zuge der Bibliothekssynthese in erster Linie durch die verwendeten, synthetisch hergestellten Oligonukleotide eingeführt werden, was auf systembedingte Kupp lungseffizienzen in der chemischen Synthese dieser zurückgeführt werden kann (Catani et al., 2020).

Nach der finalen Assemblierung der Bibliothek und Subklonierung in das Phagomid pMB04 wurden zunächst elektrokompetente *E. coli* 10-beta Zellen unter Verwendung der Bibliothek transformiert. Die nach Patrick et al., 2003 berechnete Abdeckung der Diversität lag hier mit in der Transformation erreichten $7,5 \cdot 10^7$ cfu bei 79,7 %. Um eine Wahrscheinlichkeit, dass keine Variante der Bibliothek fehlt, von 95 % zu erreichen, was einer Abdeckung von 100 % entsprechen würde, wären mindestens $9,7 \cdot 10^8$ cfu notwendig gewesen. Bei der hier erreichten Transformationseffizienz hätte es also mehr als zehnmal so viele Transformationen gebraucht, um eine nahezu vollständige Abdeckung zu erreichen, was als unverhältnismäßig angesehen wurde. Nichtsdestotrotz ist hier zu berücksichtigen, dass die theoretische Diversität der Bibliothek von ursprünglich $4,7 \cdot 10^7$ um 20,3 % auf ca. $3,7 \cdot 10^7$ verringert wurde.

Zur qualitativen Analyse der generierten Bibliothek wurden 144 Klone der Transformation in *E. coli* 10-beta sequenziert. Elf der 144 Klone (7,6 %) enthielten das Phagemid pMB04_sfGFP, welches für die Subklonierung der Bibliothek eingesetzt

wurde. Hier wäre es möglich gewesen, diesen Anteil durch längere Inkubationszeiten im Restriktionsverdau bzw. höhere Konzentrationen der Restriktionsenzyme oder einer höher aufgelösten Reinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese zu verringern. Da jedoch keine unspezifische Anreicherung von sfGFP in der Selektion oder ein erhöhtes Hintergrundsignal im Screening zu erwarten war, wurde dieser Anteil als unkritisch angesehen. Weiterhin konnten bei fünf der verbliebenen 133 Klone (3,8 %) stille Mutationen festgestellt werden, die dementsprechend keinen Einfluss auf die Funktionalität der Bibliothek haben. Jedoch wiesen neun Klone (6,8 %) *frameshift*-Mutationen auf, was Leserahmenverschiebungen zur Folge hatte und somit zu nicht-funktionalen Varianten führte. Daraus resultierte eine Funktionalität auf DNA- und Protein-Ebene von 93,2 %. Die relativen Häufigkeiten der kanonischen Aminosäuren (siehe Abbildung 7) an den randomisierten Positionen zeigten zudem, dass weder Stoppcodon noch das ausgeschlossene Cystein auftraten. Die Schwankung der relativen Häufigkeiten um die Wahrscheinlichkeit von 5,3 % liegt in der Normalverteilung dieser begründet. Demzufolge konnte hiermit bestätigt werden, dass die Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen den gewünschten Effekt erzielte. Die erfolgreiche Anwendung der Leserahmenselektion konnte zudem dadurch bestätigt werden, dass ein Verzicht auf diesen Optimierungsschritt zu einer stark verminderten Funktionalität führte, was im Rahmen der Promotionsarbeit von Frau Dr. Gissel gezeigt wurde, wo lediglich eine Funktionalität von ca. 20 % gewährleistet werden konnte (Gissel, 2017), während hier unter Verwendung der Leserahmenselektion eine Funktionalität von 93,2 % erreicht wurde. Dabei liegt dieser Wert auch sehr nah an der Funktionalität von 95,8 %, welche zuvor für eine Trypsilicase-basierte Bibliothek mit vergleichbarer Synthesestrategie erzielt wurde (Böhme, 2021). Aufgrund dessen kann auch die Reproduzierbarkeit der verwendeten Synthesestrategie bestätigt werden.

Im Rahmen der finalen Transformation der Bibliothek in *E. coli* ER2738 Zellen konnten lediglich $2,6 \cdot 10^7$ cfu generiert werden. Bezogen auf die ursprüngliche, theoretische Diversität der Bibliothek von $4,7 \cdot 10^7$ entsprach das nach Patrick et al., 2003 einer Abdeckung von 42,6 %. Bezogen auf die im Rahmen der Transformation von *E. coli* 10-beta Zellen bereits verminderte Diversität (um 20,3 % auf

$3,7 \cdot 10^7$) entsprach dies einer Abdeckung von 50,5 %. Dementsprechend ist im Zuge dieser Transformation ca. die Hälfte der Diversität verloren gegangen. Hier könnte die Transformationseffizienz durch zusätzliche Reinigung und Entsalzen der Phagemid-Präparation (siehe 3.1.9) erhöht werden, da dadurch die Ionenstärke des Ansatzes verringert wird, wodurch wiederum der Widerstand der Lösung und damit auch die Pulslänge in der Elektroporation beeinflusst wird. Letztendlich wurde eine Diversität von $2,6 \cdot 10^7$ jedoch als ausreichend angesehen, um eine genügende Wahrscheinlichkeit zu generieren, dass optimierte Trypsiligase-Varianten in dieser Bibliothek enthalten sein können.

5.2 Selektion und Screening potentiell optimierter Varianten

Zur Anreicherung funktioneller bzw. optimierter Varianten aus der generierten Trypsiligase-Bibliothek sollte eine Selektion mittels Phagen-Display durchgeführt werden. Die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Bordusa (MLU Halle-Wittenberg) etablierte und hier ebenfalls angewandte Strategie zur direkten Selektion mittels Phagen-Display ist in Kapitel 1.4 (Abbildung 3) beschrieben. Die Durchführung ist detailliert in Kapitel 3.4 erläutert, während die im Zuge des Phagen-Displays bestimmten Phagenmengen der einzelnen Selektionsrunden und Fraktionen (Start, Waschen, Elution) in Kapitel 4.2 zusammengefasst sind. Insgesamt wurden vier Selektionsrunden durchgeführt. Dabei wurden von Runde zu Runde verschiedene Parameter wie die Menge der eingesetzten M-270 Beads, die Anzahl der Waschschrifte, die Konzentration an Nukleophil-Peptid in der Elution und die Inkubationszeit für die Elution variiert. Die Streptavidin-beschichteten M-270 Beads wurden dabei jeweils mit dem biotinylierten Substrat-Peptid Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH gesättigt, wodurch die Menge der Beads auch die eingesetzte Menge des Substrat-Peptides limitierte. Das Ziel dieser Variation war es, den Selektionsdruck bzw. die Stringenz der Selektion von Runde zu Runde zu erhöhen, um eine Anreicherung optimierter Varianten zu begünstigen (G. P. Smith & Petrenko, 1997). Als Maß für die Anreicherung verbesserter Varianten sind in Tabelle 24 die Verhältnisse bzw. Quotienten der Phagenmengen in den entsprechenden Elutionsfraktionen und der jeweils letzten Waschfraktion je Selektionsrunde aufgelistet. Zudem sind hier die in den jeweiligen Selektionsrunden angewendeten

Parameter zur Anzahl der Waschschrifte und Konzentration an Nukleophil-Peptid als Maß für die Stringenz wiedergegeben.

Tabelle 24: Übersicht zum angewendeten Selektionsdruck im Phagen-Display und Anreicherung funktioneller Varianten. In der Tabelle sind Parameter der einzelnen Selektionsrunden zur Anzahl der Waschschrifte und eingesetzten Konzentration an Nukleophil-Peptid in der Elution zusammengefasst. Zudem ist als Maß für die Anreicherung funktioneller Varianten das Verhältnis von eluierten Phagen zur Phagenanzahl in der letzten Waschfraktion je Selektionsrunde wiedergegeben.

Selektionsrunde	1	2	3	4
Anzahl Waschschrifte	5	8	10	12
c (Nukleophil-Peptid) [μM]	100	50	10	2
Verhältnis Phagen Elution/Waschen	2,2	3,4	2,4	5,1

Anhand dieser Daten wird ersichtlich, dass das Verhältnis von eluierten Phagen in Bezug auf die letzte Waschfraktion von Runde 1 zu Runde 2 und von Runde 3 zu Runde 4 jeweils anstieg, obwohl der Selektionsdruck erhöht wurde. Nur von Runde 2 zu Runde 3 sank das Verhältnis leicht, was hier auf den stark erhöhten Selektionsdruck durch Reduzierung der Nukleophil-Peptid-Konzentration um den Faktor 5 erklärt werden kann. Eine ausgeprägte Anreicherung optimierter Varianten in Selektionsrunde 3 würde auch erklären, dass das Verhältnis in Runde 4 wieder anstieg, obwohl der Selektionsdruck im gleichen Maße wie in Runde 3 erhöht wurde. Letztlich gibt dieses Verhältnis jedoch nur einen Hinweis auf eine mögliche Anreicherung funktioneller und verbesserter Varianten mittels Phagen-Display. Um eine verlässliche Aussage treffen zu können, ob anhand des Phagen-Displays erfolgreich funktionelle und verbesserte Varianten angereichert werden konnten, wäre die primäre Charakterisierung einer Vielzahl von Einzelvarianten jeder Selektionsrunde notwendig.

Nach der Selektion mittels Phagen-Display sollten aus dem Pool angereicherter Varianten jene identifiziert werden, welche verbesserte Syntheseeigenschaften aufweisen. Diese Identifikation sollte anhand eines ELISA-basierten Hochdurchsatz-Screenings im Mikrotiterplatten-Format erfolgen. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit die Biosynthese von Trypsilinase im MTP-Format validiert (siehe 4.3.1), deren erfolgreiche Durchführung eine Mindestanforderung an das

Screening darstellte. Dabei galt es zunächst, ein geeignetes Expressionssystem auszuwählen. Häufig wird *E. coli* als Expressionssystem für die Biosynthese im MTP-Format angewendet (Leemhuis et al., 2009). Hier konnte Frau Dr. Sandra Liebscher (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Liebscher, 2008)) im Rahmen ihrer Promotionsarbeit jedoch bereits zeigen, dass eine Expression von Trypsin in *E. coli* keine oder nur geringere Ausbeuten an löslichem Protein liefert. Die Sezernierung ins Periplasma würde zudem einen periplasmatischen Aufschluss im MTP-Format bedingen. Dahingegen ist die Biosynthese von Trypsin in Hefe bereits zahlreich beschrieben und auch in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Frank Bordusa (MLU Halle-Wittenberg) etabliert (Gissel, 2017; Hedstrom et al., 1994, 1996; Liebscher, 2008). Zudem erleichtert hier die Sezernierung von Trypsin in das Medium die Separation.

Als Hefe-basiertes Expressionssystem für die Biosynthese im MTP-Format wurde schließlich *Pichia pastoris* ausgewählt, was auf die folgenden Gründe zurückzuführen ist. Zum einen liefert die Biosynthese rekombinanter Proteine in *P. pastoris* häufig hohe Ausbeuten, was anhand zahlreicher Beispiele in der Literatur beschrieben ist und sich hier positiv auf das Signal-Rausch-Verhältnis im Screening auswirken würde (Cregg et al., 2000). Die Induktion durch Methanol-Zugabe über den *AOX1*-Promotor ist zudem effizient und im MTP-Format einfach umsetzbar. Weiterhin ermöglicht die Verwendung des Expressionsvektors pPICZ α A die Integration der Expressionskassette in das Genom mittels homologer Rekombination, was stabile Transformanten auch ohne den Einsatz von Antibiotika bedeutet. Zudem war auch die geringe Rate an *Multicopy*-Integrationen bei Verwendung von *P. pastoris* und pPICZ α A ein entscheidendes Kriterium. Während solche *Multicopy*-Integrationen, also die Integration mehrerer Kopien des zu exprimierenden Gens in das Genom eines Klons, bei Hefe-basierten Expressionsstämmen wie *Kluyveromyces lactis* häufig auftreten und auch gewünscht sind (Read et al., 2007), wären diese *Multicopy*-Integrationen in dem hier verwendeten Screening kontraproduktiv. Schließlich würde ein derartiger Klon verschiedene Trypsilase-Varianten exprimieren, wodurch in dieser Kavität einer MTP unterschiedliche Varianten vorlägen, was zu Falsch-negativ-Ergebnissen führen könnte oder, bei einem positiven Signal, die Zuordnung der erhöhten Aktivität zu der verursachenden

Enzym-Variante schwierig gestalten würde. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von *P. pastoris* liegt zudem in der geringen endogenen Proteinsekretion dieser Hefeart, was mögliche Hintergrundsignale im Screening reduziert (Tachioka et al., 2016).

Die Durchführung der Validierung ist in Kapitel 3.5.1 detailliert beschrieben. Anhand einer Testexpression der Trypsiligase im MTP-Format mit 96 Kavitäten wurde die OD_{600} jeder Kavität bestimmt (Abbildung 8C) und der Proteingehalt ausgewählter Kavitäten mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 8A-B). Die OD_{600} -Messungen wiesen hier auf ein gleichmäßiges Zellwachstum hin, da bei einem Mittelwert von 10,6 nur eine geringe Standardabweichung von 1,2 erzielt wurde. Ausreißer wie Kavität H11 ($OD_{600} = 5,3$) könnten durch unzureichende Belüftung bzw. Versorgung mit Sauerstoff erklärt werden, was einen entscheidenden Faktor in der Fermentation von *P. pastoris* darstellt (Li et al., 2007). Auch die Ergebnisse der SDS-PAGE wiesen auf eine gleichmäßige Biosynthese hin, da in nahezu allen Proben eine Proteinbande bei dem erwarteten Molekulargewicht für Trypsiligase detektiert werden konnte und die Bandenintensität in allen Kavitäten relativ konstant war. Lediglich in Kavität A12 konnte keine Proteinbande für Trypsiligase detektiert werden. Die Ursache hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Die Isolierung der genomischen DNA des betroffenen *P. pastoris* Klons und eine Sequenzierung des Gens der Trypsiligase hätten hier Aufschluss über die intakte Beschaffenheit geben können. Schlussendlich wurden die im Zuge der Testexpression generierten Überstände eingesetzt, um unter Verwendung des ELISA-basierten Screenings die katalytische Aktivität der Trypsiligase nachweisen zu können (Abbildung 8D). Dabei konnte die Produktbildung eindeutig mittels ELISA bestätigt werden. Anhand der eingesetzten Verdünnungen der Überstände konnte zudem die Konzentrationsabhängigkeit der Enzymkatalyse gezeigt werden. Die verwendete Referenz mit 1 μM Trypsiligase zeigte dabei die schnellste Produktzunahme, woraus geschlussfolgert werden kann, dass die effektive Enzymkonzentrationen in den verdünnten Überständen geringer als 1 μM war. Deswegen wurde im eigentlichen Screening auf eine Verdünnung der Überstände verzichtet, um ein möglichst optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen.

Auf Grundlage der erfolgreich validierten Biosynthese von Trypsiligrase im MTP-Format und dem, im Zuge der Promotionsarbeit von Herrn Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)), etablierten ELISA-basierten Hochdurchsatzscreening wurden nun insgesamt 368 Einzelvarianten analysiert. Die Durchführung des Screenings ist detailliert in den Kapiteln 3.5.3 und 3.5.4 beschrieben. In Abbildung 9 (Kapitel 4.3.2) sind die dabei generierten Progresskurven der 18 identifizierten Varianten dargestellt. Auffällig war hier der geringe prozentuale Anteil an Varianten von 4,9 %, für welche überhaupt eine Aktivität im Screening detektiert werden konnte. Dieser Umstand könnte damit erklärt werden, dass mindestens eine der randomisierten Positionen kritisch für die enzymatische Aktivität der Trypsiligrase ist. Um diese Theorie zu bestätigen, wäre es hier notwendig gewesen, auch eine Reihe von Varianten zu sequenzieren, welche keine Aktivität zeigten, um die Mutationen entsprechend mit jenen identifizierter, aktiver Varianten vergleichen zu können. Nichtsdestotrotz konnten 18 funktionelle Varianten erfolgreich identifiziert werden. Zudem erreichte Variante 1C11 hier bereits die höchsten Signalintensitäten und unterschied sich damit deutlich von der Trypsiligrase-Referenz. Aber auch Variante 4F8 erreichte hier mit einem normierten A_{450} -Wert von ca. 1,5 höhere Signalintensitäten als die gemittelten Werte für Trypsiligrase. Da diese beiden Varianten 1C11 und 4F8 im Zuge der primären Charakterisierung auch als die beiden besten Varianten resultierten, kann dementsprechend auch die Eignung des verwendeten Screening-Systems zur Diskriminierung hinsichtlich der Syntheseeffizienz bestätigt werden.

5.3 Herstellung und primäre Charakterisierung identifizierter Varianten

An die erfolgreiche Identifizierung von 18 Varianten anhand des ELISA-basierten Screenings schloss sich eine primäre Charakterisierung dieser Varianten an. Hierdurch sollten Informationen zu den eingeführten Mutationen und zur Diskriminierung zwischen den Varianten hinsichtlich des synthetischen Potentials erhalten werden. Der erste Schritt im Zuge dessen bestand in der Sequenzierung der 18 identifizierten Varianten (siehe 4.4.1). Hierbei wiesen die Chromatogramme der Sanger-Sequenzierung von fünf Varianten Doppelpeaks an den randomisierten Positionen auf. Dementsprechend waren bei diesen die Gene von mindestens zwei

unterschiedlichen Trypsiligase-Varianten in die Genome der betroffenen Klone integriert. Das hatte zur Folge, dass die DNA-Sequenzen der verschiedenen Varianten nicht klar aufgelöst werden konnten, weswegen diese fünf Varianten bzw. Klone verworfen wurden. Um die Transformation mehrerer Gene bzw. Vektormoleküle in einen *P. pastoris* Klon zu vermeiden und damit die Rate solcher multiplen Insertionen zu reduzieren, könnte zukünftig die in der Elektroporation (siehe 3.2.3) eingesetzte DNA-Menge verringert werden. Im Umkehrschluss würde das aber die Transformationseffizienz und damit die Anzahl generierter Klone senken (Chassy et al., 1988).

Die Sequenzierungsergebnisse fünf weiterer Varianten zeigten das Gen der Trypsiligase als Ausgangsvariante. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Varianten der Gen-Bibliothek handelt, welche zufällig an den randomisierten Positionen die Aminosäuren der Trypsiligase aufwiesen, da die verwendeten Codone für die betroffenen Aminosäuren in der Bibliothek von jenen des Gens der Trypsiligase abwichen. Demzufolge handelte es sich hierbei um den Expressionsvektor pPICZ α A_4Tn, welcher für die Subklonierung der Gene der angereicherten Varianten in den Vektor pPICZ α A mittels Megaprimer-Mutagenese verwendet wurde (siehe 4.3.2 und 3.1.7). Um diese Hintergrundaktivität bzw. die Häufigkeit der Trypsiligase im Screening durch das mitgeführte Template pPICZ α A_4Tn zu verringern, kann der DpnI-Verdau nach der Megaprimer-PCR optimiert werden, indem die Konzentration an DpnI erhöht oder die Inkubationszeit verlängert wird. Die Sequenzierungsdaten der übrigen acht Varianten bestätigten deren Integrität, den Ursprung aus der randomisierten Bibliothek und das Vorliegen von Einzelklonen, deren Mutationen an den randomisierten Positionen dementsprechend aufgelöst werden konnten und in Tabelle 17 (siehe 4.4.1) wiedergegeben sind. Lediglich die drei Varianten 2C11, 3G2 und 4E1 wiesen hier Unregelmäßigkeiten auf, da diese Varianten an den Positionen 214, 219 und 221 die Codone der Trypsiligase besaßen. Wie bereits beschrieben, konnte auch hier der Ursprung aufgrund der unterschiedlichen Codonverwendung klar identifiziert werden. Dementsprechend besaßen diese Varianten an den Positionen 95, 96 und 99 Codone aus der Bibliothek, während an den Positionen 214, 219 und 221 Codone aus dem Gen der Trypsiligase auftraten. Die Ursache für dieses Phänomen liegt wahrscheinlich in

der Megaprimer-Mutagenese begründet (siehe 4.3.2 und 3.1.7), wobei hier die Synthese des Megaprimer mittels PCR bzw. dessen Aufreinigung der kritische Punkt sein könnte. Da über diesen Megaprimer die Mutationen an den randomisierten Positionen in den Vektor pPICZ α A_4Tn eingeführt wurden, könnten am 3'-Ende verkürzte PCR-Produkte bzw. Megaprimer, welche mittels Agarose-Gel-elektrophorese nicht sauber abgetrennt wurden, dazu führen, dass nur die am 5'-Ende liegenden Positionen (95, 96 und 99) transferiert werden, während die Positionen am 3'-Ende (214, 219 und 221) unverändert bleiben. Solche Artefakte sind in der Literatur für die PCR unter Verwendung von multiplen Templates bzw. Mischungen eng verwandter Sequenzen beschrieben und werden als PCR-vermittelte Rekombination oder chimäre Amplifikation bezeichnet (Kanagawa, 2003; Potapov & Ong, 2017). Ein diskutiertes Modell zur Entstehung solcher Rekombinationen besteht in der Bindung eines Primers an die Zielsequenz und die Elongation durch die DNA-Polymerase, welche aufgrund einer Rehybridisierung eines komplementären DNA-Stranges an das Template unterbrochen wird, wodurch ein unvollständig verlängerter Primer entsteht. Hybridisiert dieser unvollständig verlängerte Primer in folgenden PCR-Zyklen erneut an einen anderen Template-Strang, entstehen chimäre Amplifikationsprodukte aus zwei unterschiedlichen Genen (Odelberg et al., 1995). Aufgrund des in dieser Arbeit verwendeten Primer-Designs würde hier bereits eine Verkürzung des Megaprimer um ca. 100 Basenpaare ausreichen, um den beschriebenen Effekt zu erzeugen. Abhilfe kann hier eine höher aufgelöste Agarose-Gelektrophorese schaffen, um solche verkürzten PCR-Produkte abtrennen zu können. Um die Häufigkeit solcher Rekombinationen zu verringern, wird in der Literatur auch die Erhöhung der Elongationszeit oder die Reduzierung der Zyklenanzahl beschrieben (Lahr & Katz, 2009; Meyerhans et al., 1990).

Nach deren Sequenzierung wurden die acht Varianten, wie in den Kapiteln 3.2.4, 3.3.2 und 4.4.2 detailliert beschrieben, anhand einer Biosynthese in *P. pastoris* X33 und unter Verwendung einer chromatografischen Zweischritteinigung hergestellt und gereinigt. Die Chromatogramme der Reinigung sowie die Ergebnisse der Analytik mittels SDS-PAGE und LC/MS sind exemplarisch für Variante 1C11 in Abbildung 10 dargestellt, wobei hier eine hohe Homogenität und Reinheit der hergestellten Enzyme bestätigt werden konnte. In Tabelle 18 sind zusätzlich die

erzielten Expressionsausbeuten zusammengefasst, welche für die acht Varianten mit 3,1-8,8 mg/l Kultur unter der gewöhnlich für Trypsiligase erzielten Ausbeute von 14,3 mg/l Kultur lagen. Eine Tendenz sinkender Expressionsausbeuten der generierten Varianten gegenüber Trypsiligase konnte auch von Herrn Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)) im Zuge seiner Promotionsarbeit beobachtet werden, was er zum Teil auf eine zusätzliche Hydrophobizität durch eingeführte Tryptophane an Lösungsmittel-exponierten Positionen zurückführte. Ein solcher Zusammenhang konnte hier jedoch nicht festgestellt werden, da z.B. Variante 1C11 mit 3,1 mg/l Kultur die geringste Ausbeute zeigte und kein Tryptophan an einer der sechs Positionen besaß, während bei Variante 2B9 ein Tryptophan an Position 221 vorlag und trotzdem eine Ausbeute von 6,4 mg/l Kultur erzielte. Auch ein Vergleich weiterer Mutationen an den randomisierten Positionen mit den jeweils erzielten Ausbeuten ließ hier keine Korrelation der Expressionsausbeute mit der Hydrophobizität erkennen. Während die verringerten Expressionsausbeuten in dem hier angewendeten Labormaßstab geringe bis keine Auswirkungen hatten, könnte dieser Faktor in einer großtechnischen Anwendung jedoch zu Limitationen führen. Da in diesem Fall die Biosynthese im Fermenter statt der Expression im Schüttelkolben vorzuziehen wäre, könnten die verringerten Ausbeuten so negiert werden. Schließlich führt die Produktion rekombinanter Proteine in *P. pastoris* unter Verwendung eines Bioreaktors in der Regel zu deutlich gesteigerten Zelldichten und damit auch Proteingehalt, was vorrangig darauf zurückzuführen ist, dass Parameter wie die Zufuhr an Sauerstoff oder der Kohlenstoffquelle und auch der pH-Wert kontrolliert und gesteuert werden können (Cereghino et al., 2002).

Da alle acht Varianten erfolgreich dargestellt werden konnten, wurden sie nun einer primären Charakterisierung hinsichtlich ihres synthetischen Potentials unterzogen. Zu diesem Zweck wurden Transamidierungsstudien unter Verwendung der Varianten, wie in den Kapiteln 3.6.1 und 4.4.3 detailliert beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien sind zusammenfassend in Tabelle 19 (siehe Kapitel 4.4.3) dargestellt, wobei hier auch jeweils die Mutationen an den randomisierten Positionen wiedergegeben sind, welche aus den Sequenzierungsdaten (siehe Kapitel 4.4.1) abgeleitet wurden. Wie in Kapitel 5.1 bereits beschrieben

wurde, ist das synthetische Potential der Trypsiligase-Varianten in erster Linie von dem Verhältnis der Aminolyse- zur Hydrolyseaktivität abhängig. Die Varianten 1C11 und 4F8 zeigten hier die höchsten Quotienten aus den apparenten Wechselzahlen von Aminolyse zu Hydrolyse mit 61,7 bzw. 55,9 und erreichten auch die höchsten maximalen Ausbeuten von 61,8 % bzw. 61,9 %. Dementsprechend konnte diese Korrelation hier bestätigt werden. Die Steigerung dieses Quotienten um den Faktor 17-19 im Vergleich zur Trypsiligase resultierte dabei im Wesentlichen aus einer um den Faktor 50-70 verringerten Hydrolyseaktivität. Während die Varianten 1C11 und 4F8 hier also als die beiden effizientesten Varianten ermittelt werden konnten, sei an dieser Stelle auch darauf hingewiesen, dass alle acht im Screening identifizierten Varianten im Vergleich zur Trypsiligase einen verbesserten Quotienten von Aminolyse zu Hydrolyse und damit auch eine höhere maximale Ausbeute erreichten. Dieses Resultat bestätigt wiederrum die erfolgreiche und effiziente Anwendung des semi-rationalen Enzym-Designs.

Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang ist, welche Aminosäurepositionen oder -austausch der Varianten wesentlich zur Optimierung deren synthetischen Potentials beigetragen haben. Die Beantwortung dieser Frage ließe auch Rückschlüsse zu, welche der im Bibliotheksdesign zur Positionsauswahl angewandten, theoretischen Ansätze (siehe Kapitel 5.1) zielführend waren. Obwohl diese Frage anhand der hier vorgestellten Daten nicht abschließend geklärt werden kann, so geben sie doch Hinweise. So fällt beispielsweise auf, dass trotz Randomisierung und damit dem möglichen Vorkommen von 19 verschiedenen Aminosäuren an Position 214 neben der nativen Aminosäure Serin nur Glycin und Alanin vorgefunden wurden. Dieser Befund bestätigt die in der Literatur aufgeführten und in Kapitel 5.1 herangezogenen Aussagen und Ergebnisse zu Serin 214, wonach diese Position stark konserviert ist und Mutationen einen erheblichen Einfluss auf die native Hydrolyseaktivität von Trypsin haben können. Insbesondere die Mutation S214G scheint hier zuträglich für die Syntheseeffizienz zu sein, da die besten Varianten 1C11 und 4F8 beide diese Mutation tragen. So könnte diese Mutation für die stark verringerte Hydrolyseaktivität verantwortlich sein. Um diese Theorie und auch den Einfluss der anderen Mutationen der Variante 1C11 zu analysieren, hat Frau Julia Simon (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Simon, 2018)) im

Rahmen ihrer Masterarbeit 1C11 Varianten mit Rückmutationen generiert und in Transamidierungsstudien untersucht. Dabei konnte sie zeigen, dass die Variante 1C11_G214S eine um den Faktor 6-20 erhöhte Hydrolyseaktivität im Vergleich zur Variante 1C11 aufwies, womit die Position 214 den größten Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit hatte. Anhand der in Tabelle 19 gezeigten apparenten Wechselzahlen der Hydrolyseaktivität der Varianten 4C12, 3G2, 4E1 und 2C11, welche an Position 214 weiterhin das native Serin tragen, konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Hydrolyseaktivität auch ohne die Mutation S214G gesenkt werden konnte. Dementsprechend müssen hier auch die übrigen Positionen einen Einfluss haben.

Neben der Position 214 zeichnete sich auch für die Position 99 ein Trend bzw. ein Konsensusmotiv der Mutationen ab. So wiesen alle acht Varianten Aminosäuren mit unpolaren bzw. aromatischen Seitenketten an dieser Position auf. Besonders herauszustellen ist hier aber, dass die drei besten Varianten 1C11, 4F8 und 2B9 jeweils die Mutation L99F trugen. Dieses Ergebnis ist umso beachtlicher, wenn zusätzlich berücksichtigt wird, dass auch die im Rahmen der Promotionsarbeit von Herrn Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)) generierte Variante 2G10 genau diese Mutation L99F besaß. Herr Dr. Böhme wendete dabei ein Bibliotheksdesign mit grundlegend anderen Randomisierungspositionen (H40, A55, K97, L99, S190, Q192) als den in dieser Arbeit vorgestellten an. Nur Position 99 wurde in beiden Bibliotheken verwendet. Als das Enzym mit dem höchsten synthetischen Potential resultierte schließlich die Variante 2G10 aus den Arbeiten von Herrn Dr. Böhme. Neben dieser wiesen noch drei weitere im Screening identifizierte Varianten die Mutation L99F auf. Dementsprechend ist hier eine deutliche Tendenz zu erkennen, welche ebenfalls für die Syntheseeffizienz zuträglich zu sein scheint. Die Bedeutung der Mutation L99F für die Syntheseeffizienz der Variante 1C11 wurde ebenfalls von Frau Simon im Zuge ihrer Masterarbeit untersucht. Nach der Mutation S214G (Faktor 8 - 38) hatte die Mutation L99F den zweitgrößten Einfluss auf den Quotienten von Aminolyse zu Hydrolyse (Faktor 2 - 4). Im Rahmen der Masterarbeit von Frau Caroline Schmidt (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Schmidt, 2018)) wurde auch der Einfluss dieser Mutation auf die Syntheseeffizienz der Variante 2G10 untersucht. Die Rückmutation F99L

führte dabei zu einer Verringerung des Quotienten von Aminolyse zu Hydrolyse um den Faktor 3. Damit scheint ein Phenylalanin in Position 99 für das synthetische Potential beider Varianten 1C11 und 2G10 gleichermaßen vorteilhaft zu sein. Die restlichen Positionen betreffend konnte anhand der Daten aus der primären Charakterisierung kein klarer Trend interpretiert werden. Lediglich für Position 221 konnte, wie auch schon für Position 99, eine Tendenz zu unpolaren Aminosäureseitenketten verzeichnet werden. Anhand der Rückmutationen der Positionen 96 und 219 konnte Frau Simon einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Syntheseeffizienz nachweisen (Faktor 1,5 - 2), während der Effekt durch die Rückmutation der Position 221 nahezu irrelevant war (Faktor <1,3). Da die Variante 1C11, wie auch Trypsiligase, an Position 95 eine Asparaginsäure aufwies, wurde der Einfluss dieser Position in Folgeexperimenten nicht näher untersucht. Die Rückmutation dieser Position in Variante 4F8 hätte hier aber zusätzliche Informationen liefern können, wenngleich angesichts der hohen Syntheseeffizienz von Variante 1C11 der Einfluss von Position 95 wahrscheinlich gering ausfällt.

5.4 Präferierte Erkennungssequenz der optimierten Varianten 1C11 und 4F8

Da die Trypsiligase-Varianten 1C11 und 4F8 anhand der primären Charakterisierung als die effizientesten Biokatalysatoren für die Transamidierungsreaktion bestätigt werden konnten, sollte anschließend überprüft werden, inwieweit die eingeführten Mutationen die Akzeptanz verschiedener Erkennungssequenzen beeinflusst haben bzw. ob Peptide mit der Sequenz YRH weiterhin das optimale Substrat darstellen. Zu diesem Zweck wurden, wie in Kapitel 3.6.2 detailliert beschrieben, Hydrolysestudien unter Verwendung einer Peptid-Bibliothek mit Variation der Aminosäuren in P1-, P1'- und P2'-Position durchgeführt. Die hierbei bestimmten apparenten Wechselzahlen der Hydrolyseaktivität der Varianten 1C11 und 4F8 für die verschiedenen Substrat-Peptide sind in Abbildung 11A dargestellt (siehe Kapitel 4.5). Beide Varianten zeigten hier ein sehr ähnliches Aktivitätsprofil, wobei vor allem eine Präferenz für aromatische und aliphatische Aminosäuren in P1-Position festgestellt werden konnte. Ein Leucin, Tryptophan oder Phenylalanin anstelle von Tyrosin in P1-Position führte sogar zu einer gesteigerten Hydrolyseaktivität um den Faktor 3,3 - 4,6. Dahingegen konnte keine Hydrolyseaktivität verzeichnet

werden, wenn ein Arginin in P1-Position vorlag, was der nativen Enzymspezifität von Trypsin entsprechen würde (Huber et al., 1974). Eine derartige Veränderung der P1-Enzymspezifität von Trypsin ist in der Literatur bereits beschrieben und mit einer Mutation von Aspartat 189 assoziiert, wodurch eine dem Chymotrypsin ähnliche Spezifität induziert wird (Graf et al., 1987; Perona et al., 1995). Aufgrund dessen zeigt auch die Trypsiligase, welche die Mutation D189K trägt, eine Präferenz für Tyrosin in P1-Position (Liebscher, 2008), wobei diese Präferenz durch die zusätzlichen Mutationen der Varianten 1C11 und 4F8 scheinbar zu den Aminosäuren Leucin, Tryptophan und Phenylalanin verschoben wurde. Zudem führte auch der Austausch von Arginin in P1'-Position durch Lysin zu einer Steigerung der Hydrolyseaktivität.

Die Auswertung der Hydrolysestudien gestaltete sich jedoch insgesamt schwierig, da trotz Messung der initialen Produktbildung (Umsatz <5 %), keine linearen Kurvenverläufe vorlagen, wodurch die lineare Regression zur Bestimmung der apparenten Wechselzahlen mit relativ hohen Fehlern verbunden war (siehe Abbildung 11B; $R^2(YRH) = 0,96799$; $R^2(LRH) = 0,91834$). Zwei mögliche Ursachen für die beobachtete Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit im Laufe der Reaktion waren hier denkbar. Zum einen wäre es möglich, dass die verwendete Substratkonzentration von 1 mM nah am K_M -Wert lag, wodurch die Reduzierung der Substratkonzentration durch den enzymatischen Umsatz auch die Reaktionsgeschwindigkeit relativ stark senken würde. Anhand der Progresskurve für den Umsatz des Substratpeptides Bz-AAYRHAAG-OH (Abbildung 11B; Violett), ist jedoch festzustellen, dass im beobachteten Reaktionszeitraum von 480 s lediglich ca. 15 μM Hydrolyseprodukt generiert wurden, wonach die Substratkonzentration von 1 mM auf 985 μM gesenkt wurde. Für die Kombination von Variante 1C11 mit dem Substratpeptid Bz-AAYRHAAG-OH wurde, wie Kapitel 4.6.1 entnommen werden kann, ein K_M -Wert von 84,1 μM bestimmt (siehe Tabelle 22). Dementsprechend lag die Substratkonzentration mit 985 μM nach 480 s Reaktionszeit immer noch mehr als Faktor 10 über dem K_M -Wert, wodurch diese Ursache ausgeschlossen werden konnte.

Die zweite mögliche Ursache beruhte darauf, dass im Zuge der Hydrolyse der Substratpeptide peptidische Nukleophile generiert werden, welche in Konkurrenz mit

Wassermolekülen in der Deacylierungsreaktion treten. Wird z.B. das Peptid Bz-AAYRHAAG-OH hydrolysiert, entstehen die Produkte Bz-AAY-OH und H-RHAAG-OH. Das Produkt H-RHAAG-OH verfügt über einen freien *N*-Terminus, wodurch es in Folgereaktionen als Nukleophilpeptid agieren kann. Das würde zur Deacylierung eines Acyl-Enzym-Intermediats durch Aminolyse führen, womit diese Reaktion in Konkurrenz zur Deacylierung mit Wasser und damit der Hydrolyse tritt. Desto weiter der Reaktionsverlauf also voranschreitet, desto mehr Hydrolyseprodukt entsteht, wodurch auch die Konzentration des Nukleophilpeptides steigt. Umso wahrscheinlicher wird folgerichtig die Aminolyse des Acyl-Enzym-Intermediates durch das Nukleophil H-RHAAG-OH, was zur Rückbildung des Eduktes Bz-AAYRHAAG-OH führt. Dadurch sinkt die anteilige Hydrolyserate, wodurch die Hydrolysegeschwindigkeit im Reaktionsverlauf sinkt. Angesichts dessen, dass für das Nukleophil H-RHAK-OH mit dem Substrat Bz-AALRHAAG-OH und der Variante 1C11 ein K_M -Wert von 51,0 µM bestimmt wurde (siehe Kapitel 4.6.1; Tabelle 23) und in der Hydrolyse dieses Substratpeptides nach 480 s Reaktionszeit bereits ca. 30 µM Hydrolyseprodukt und damit auch Nukleophilpeptid vorlagen (Abbildung 11B; Türkis), sollte hier bereits eine ausgeprägte Aminolyseaktivität vorhanden gewesen sein. Damit gilt diese Ursache als wahrscheinlich. Da dieser Zusammenhang jedoch nicht näher analysiert wurde, kann hier keine finale Aussage getroffen werden.

Um aussagekräftigere Daten hinsichtlich der präferierten Erkennungssequenz zu erhalten, auch unter dem Standpunkt, dass eine Analyse anhand der Transamidierungsreaktion eine Beurteilung in Bezug auf die Syntheseeffizienz und damit der praktischen Anwendung der Enzyme zulässt, wurden zusätzliche Transamidierungsstudien durchgeführt. Diese Studien wurden wiederum unter Verwendung der Varianten 1C11 und 4F8 realisiert, wobei als Substratpeptide diejenigen zum Einsatz kamen, für welche 1C11 und 4F8 in den vorangegangenen Hydrolysestudien die höchsten Aktivitäten zeigten. Dementsprechend wurden hier die Erkennungssequenzen YKH, LRH, WRH und FRH im Vergleich zu YRH näher untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 (siehe Kapitel 4.5) zusammengefasst, wobei hier wie bereits im Zuge der primären Charakterisierung neben der maximalen Ausbeute die apparenten Wechselzahlen der

Aminolyse und Hydrolyse sowie deren Quotient bestimmt wurden. Dabei kristallisierte sich die Erkennungssequenz LRH deutlich als jene heraus, für welche die beiden Trypsiligase-Varianten 1C11 und 4F8 die höchste Präferenz zeigten. Um einen Faktor von 20-30 gesteigerte Aminolyseaktivitäten resultierten in einem stark gestiegenen Quotienten von Aminolyse zu Hydrolyse und demzufolge auch in maximalen Ausbeuten von 65,4-65,6 %, welche damit nah an der thermodynamisch maximalen Ausbeute von 66,6 % unter den angewendeten Reaktionsbedingungen lagen.

Die im Zuge der Promotionsarbeit von Frau Dr. Sabrina Gissel (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Gissel, 2017)) identifizierte Trypsiligase-Variante 4 (R62S, Q64H, S190G, Q192M) zeigte ebenfalls eine Präferenz für die Erkennungssequenz LRH, obwohl hier vollkommen andere Positionen randomisiert wurden. Insbesondere die Positionen 190 und 192 flankieren dabei die S1-Bindetasche, wodurch Mutationen in diesen Positionen die Spezifität für die P1-Aminosäure beeinflusst haben könnten (Hedstrom, 2002). Frau Dr. Gissel wies in diesem Kontext auf die gestiegene Hydrophobizität in der S1-Bindetasche aufgrund der Mutationen S190G und Q192M hin, was die Ursache sein könnte, dass die Spezifität von Tyrosin zum hydrophoberen Leucin verschoben wurde. Bei den hier beschriebenen Trypsiligase-Varianten 1C11 und 4F8 flankiert die Mutation S214G die S1-Bindetasche auf der gegenüber liegenden Seite von 190 und 192, wodurch diese Mutation einen ähnlichen Effekt induziert haben könnte. Zudem ist für Mutationen an Position 214 beschrieben, dass diese insbesondere auf die Konformation von Tryptophan 215 Auswirkungen haben können (McGrath et al., 1992). Da bei vielen Serinproteasen das Peptidrückgrat der Positionen 214-216 mit dem Peptidrückgrat der Positionen P1-P3 der Substratpeptide durch mehrere Wasserstoffbrückenbindungen interagiert und ein antiparalleles β -Faltblatt bildet (Hedstrom, 2002), liegt die Vermutung nahe, dass Mutationen in diesem Bereich die Spezifität verändern können. Eine Kokristallisation oder *Soaking*-Experimente mit den Varianten 1C11 und 4F8 unter Verwendung geeigneter Substratpeptide, Substrat-Analoga oder Übergangszustand-Analoga in Verbindung mit einer Röntgenkristallographie könnte hier Strukturdaten liefern, welche Aufschluss über veränderte Interaktionen mit dem Substratpeptid durch die eingeführten Mutationen geben.

5.5 Detaillierte enzymkinetische Charakterisierung der Variante 1C11

Bis zu diesem Bearbeitungsstand und der beginnenden detaillierten Charakterisierung konnte kein nennenswerter Unterschied zwischen den Trypsiligase-Varianten 1C11 und 4F8 festgestellt werden. Deswegen wurde die detaillierte, enzymkinetische Charakterisierung nur für Variante 1C11 durchgeführt. Da auf Basis der generierten Daten keine qualitative Diskriminierung zwischen beiden Varianten möglich war, wurde diese Auswahl willkürlich getroffen. Die Bestimmung der Parameter K_M und k_{cat} sowie die Studien zur Syntheseeffizienz, zum Einfluss der Zinkionen-Konzentration und zum Einfluss des pH-Wertes sollten dazu dienen, die Enzymspezifität der Variante 1C11 zu bestätigen, zusätzliche Informationen zur Ursache der verbesserten Syntheseeffizienz zu erhalten und prozessrelevante Daten für eine potentielle, praktische Anwendung zu liefern.

Zunächst sollten die enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} für die 1C11-katalysierte Transamidierungsreaktion unter Verwendung der Erkennungssequenzen YRH und LRH bestimmt werden. Bis dato wurden solche Analysen zur Bestimmung dieser Parameter und der Spezifität von Trypsiligase und Varianten derer in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Frank Bordusa (MLU Halle-Wittenberg) anhand von Hydrolysestudien mit ausgewählten Substrat-Peptiden durchgeführt (Böhme, 2021; Liebscher, Schöpfel, et al., 2014). Wie bereits in Kapitel 4.5 erwähnt und in Kapitel 5.4 ausführlich diskutiert, war für Variante 1C11 eine Analyse anhand der Hydrolyseaktivität jedoch nicht durchführbar, da hier die konkurrierende Aminolyseaktivität eine reine Betrachtung der Hydrolyse unmöglich machte. Aus diesem Grund wurden die Parameter K_M und k_{cat} im Rahmen dieser Arbeit für die Transamidierungsreaktion bestimmt. Um außerdem einen Vergleich zur Trypsiligase als Ausgangsvariante ziehen zu können, wurden diese Parameter auch für die Trypsiligase-katalysierte Transamidierungsreaktion bestimmt. Die Durchführung ist in Kapitel 3.6.3 detailliert beschrieben, während die Ergebnisse in Kapitel 4.6.1 zusammengefasst sind. Aus den ermittelten Werten für K_M und k_{cat} wurde hier außerdem als Maß für die katalytische Effizienz der Quotient k_{cat}/K_M berechnet (siehe Tabelle 22). Während für die Trypsiligase mit dem Substrat-Peptid Bz-AAYRHAAG-OH ein k_{cat}/K_M -Wert von $145,8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt wurde, ist dieser Wert für Variante 1C11 mit dem gleichen Substrat um ca. Faktor 2 ($285,4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

erhöht, was die gesteigerte katalytische Effizienz in der Transamidierung bestätigt. Durch Verwendung des Substrat-Peptides Bz-AALRHAAG-OH in Kombination mit Variante 1C11 wird dieser Quotient zusätzlich um einen Faktor von ca. 3 auf $874,0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erhöht, was wiederum die hohe Enzymspezifität für die Erkennungssequenz LRH bestätigt.

Die generierten Daten für die Parameter K_M und k_{cat} lieferten hier auch einen Hinweis auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Transamidierungsreaktion. Für Serinproteasen ist ein dreistufiger, kinetischer Mechanismus, bestehend aus der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes, der Acylierung und der Deacylierung, weitläufig akzeptiert (Appel, 1986). Wenn hier die Deacylierung schneller abläuft als die Acylierung und die Acylierung somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, dann korreliert eine Zunahme der Acylierungsgeschwindigkeit mit einer erhöhten Michaelis-Menten-Konstante (K_M) (Hedstrom, 2002). Anhand der in Tabelle 22 dargestellten Daten kann eine solche Korrelation zwischen den K_M -Werten und den ermittelten Wechselzahlen (k_{cat}) beobachtet werden. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die in Korrelation zu K_M gesteigerten k_{cat} -Werte auf eine erhöhte Acylierungsgeschwindigkeit zurück gehen, was die Acylierung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Transamidierung bzw. Aminolyse bestätigen würde. In der Literatur ist die Acylierung ebenfalls häufig als geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei der Hydrolyse von Amid-Substraten durch Serinproteasen beschrieben, während bei den meisten Ester-Substraten die Deacylierung als limitierender Schritt gilt (Zerner & Bender, 1964). Diese Kausalität konnte auch für Trypsin gezeigt werden (Aguirre et al., 2015). Im Falle von Trypsilinase und den Trypsilinase-Varianten müssen die Aminolyse und Hydrolyse bei solchen Betrachtungen jedoch stets getrennt voneinander beurteilt werden. Während die Acylierung bei beiden Reaktionswegen identisch ist, unterscheidet sich die Deacylierung durch Wasser oder ein peptidisches Nukleophil grundlegend. Vergleicht man die apparenten Wechselzahlen der Aminolyse bzw. Hydrolyse von Trypsilinase und Variante 1C11 (siehe Tabelle 19), so wird ersichtlich, dass im Zuge des Enzym-Engineerings zwar die Aktivität der Variante 1C11 insgesamt gesunken ist, aber die Hydrolyseaktivität um drei Größenordnungen niedriger ist, während die Aminolyseaktivität lediglich um den Faktor 3 reduziert wurde. Die Ursache für

diese drastische Reduzierung der Hydrolyseaktivität könnte auch eine stark verlangsamte Deacylierung in der Hydrolyse sein. Dabei könnte die Deacylierungsgeschwindigkeit der Hydrolyse so weit gesenkt sein, dass sie ähnlich schnell oder sogar langsamer als die Acylierungsgeschwindigkeit wird, wodurch hier nicht mehr die Acylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wäre. Dieser Zusammenhang würde wiederum erklären, warum die Verwendung von LRH als Erkennungssequenz im Vergleich zu YRH in der 1C11-katalysierten Transamidierung zu einer um den Faktor 20 gesteigerten Aminolyseaktivität führte, während die Hydrolyseaktivität nur um den Faktor 4 erhöht wurde (siehe Tabelle 20), obwohl die Acylierung für Aminolyse und Hydrolyse identisch ist. So könnten begünstigende Interaktionen von Variante 1C11 mit der LRH Erkennungssequenz den für Serinproteasen beschriebenen tetrahedralen Übergangszustand stabilisieren (Hedstrom, 2002), was die Aktivierungsenergie der Acylierung senkt und dadurch die Acylierungsgeschwindigkeit erhöht. Davon würde die Aminolyse stärker profitieren, da hier die Acylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, während dieser Effekt in der Hydrolyse aufgrund der niedrigen und damit limitierenden Deacylierungsgeschwindigkeit nur gering ausgeprägt ist. Zu diesen Ausführungen sei jedoch erwähnt, dass die in dieser Arbeit präsentierten Daten lediglich Hinweise auf die geschilderten, theoretischen Sachverhalte liefern. Um diese Theorien zu bestätigen, wäre eine Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten von Acylierung und Deacylierung als Teilreaktionen der Aminolyse und Hydrolyse notwendig. Anhand von Techniken wie der isothermen Titrationskalorimetrie (Aguirre et al., 2015) oder *Rapid Quench-Flow* (Barman et al., 2006) in Verbindung mit einer geeigneten Methode zur Konzentrationsbestimmung der Reaktionsintermediate (z.B. LC/MS) wären solche Analysen möglich.

Zu der Charakterisierung von Trypsiligase-Variante 1C11 gehörte auch die Erstellung eines Syntheseprofils. Dieses wurde mittels Transamidierungsstudien (siehe 3.6.1), wie auch in Kapitel 4.6.2 beschrieben, generiert. Die Syntheseprofile wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Frank Bordusa (MLU Halle-Wittenberg) etabliert, um aussagekräftige graphische Darstellungen generieren zu können, anhand derer die Syntheseeffizienz von Trypsiligase bzw. der Trypsiligase-Varianten in Abhängigkeit von der Substrat- und Nukleophilkonzentration beurteilt werden

kann. In Abbildung 13 sind die Syntheseprofile von Variante 1C11 in Kombination mit den Substrat-Peptiden Bz-AAYRHAAG-OH (Blau) und Bz-AALRHAAG-OH (Grün) dargestellt. Zum Vergleich ist in Abbildung 13 auch das Syntheseprofil der Trypsilicase als Ausgangsvariante für das Substrat-Peptid Bz-AAYRHAAG-OH enthalten. Die rot gestrichelte Linie markiert die thermodynamisch maximal erreichbare Ausbeute in Abhängigkeit vom eingesetzten Überschuss an Nukleophil. Dieses Maximum ergibt sich daraus, dass sowohl das Edukt als auch das Produkt der Transamidierung die Erkennungssequenzen YRH bzw. LRH enthalten und die Abgangsgruppe, welche in der Acylierung abgespalten wird, in Folgereaktionen wieder als peptidisches Nukleophil agieren kann. Dadurch findet nicht nur der enzymatische Umsatz des Eduktes zum Produkt der Aminolyse oder auch Hydrolyse statt. Auch das Transamidierungsprodukt kann als Substrat in der Acylierung fungieren. Wenn das dabei entstehende Acyl-Enzym-Intermediat in der Deacylierung mit der Abgangsgruppe des Substrat-Peptides reagiert, kommt es zur Rückbildung des Eduktes. Da sich die Aminosäuren im P1'-P3'-Bereich zwischen der Abgangsgruppe und dem hinzugefügten Nukleophil nicht unterscheiden (RHA), kann das Enzym hier nicht zwischen diesen diskriminieren. Dementsprechend ist die maximal erreichbare Ausbeute, wenn keine Hydrolyse stattfinden würde, durch den Überschuss an Nukleophil-Peptid in Relation zum Substrat-Peptid (und damit der Abgangsgruppe) begrenzt.

Aus den Syntheseprofilen wird die gesteigerte Syntheseeffizienz der Variante 1C11 deutlich ersichtlich. So erreichte sie unter allen angewendeten Bedingungen mit beiden Substrat-Peptiden höhere maximale Ausbeuten als Trypsilicase. Insbesondere für geringe Substratkonzentrationen (15 µM) konnte die Ausbeute deutlich gesteigert werden. Auch der Unterschied in der Syntheseeffizienz bei Verwendung der Erkennungssequenz YRH oder LRH mit Variante 1C11 kann anhand der Syntheseprofile herausgestellt werden. So sind die mit dem Substrat-Peptid Bz-AALRHAAG-OH (Grün) erhaltenen Ausbeuten im Vergleich zu Bz-AAYRHAAG-OH (Blau) nochmals erhöht und liegen bereits sehr nahe am theoretisch erreichbaren Maximum. Zudem konnte hier die Differenz in der maximalen Ausbeute zwischen niedriger und hoher Substratkonzentration (15 µM/250 µM) weiter minimiert werden, was insbesondere im Kontext der praktischen Anwendung dieser Enzyme

von hoher Relevanz ist. Schließlich ist die Löslichkeit von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten in wässrigen Medien durch die hohe Hydrophobizität der meisten Wirkstoffmoleküle begrenzt, was dementsprechend auch die anwendbare Konzentration in den Syntheseansätzen limitiert, wenn keine organischen Lösungsmittel eingesetzt werden sollen (Duerr & Friess, 2019). Aus diesem Grund ist eine hohe Syntheseeffizienz bei niedriger Substratkonzentration ein erheblicher Vorteil im praxisorientierten Kontext.

Aus den Syntheseprofilen (Abbildung 13) lassen sich zudem zwei grundsätzliche Tendenzen für die Transamidierungsreaktion ablesen. Zum einen korreliert die Ausbeute mit dem eingesetzten Überschuss an Nukleophil, was, wie bereits detailliert geschildert, auf das Verhältnis von Abgangsgruppe zu hinzugefügtem Nukleophil-Peptid zurückgeht. Zum anderen geht eine geringere Substratkonzentration mit einer sinkenden maximalen Ausbeute einher. Der Grund hierfür könnte wiederum in den unterschiedlichen Geschwindigkeiten von Acylierung und Deacylierung zwischen Aminolyse und Hydrolyse liegen. Sinkt die Substratkonzentration in Relation zum jeweiligen K_m -Wert, so sinkt auch die Acylierungsgeschwindigkeit. Dadurch sinkt die Aminolyseaktivität, da die Acylierung hier der limitierende Faktor ist. Die Hydrolyseaktivität ist davon jedoch in geringerem Ausmaß betroffen, da hier die Deacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist, wie in diesem Kapitel bereits diskutiert wurde. Dieser Umstand führt zu einer Verringerung des Verhältnisses von Aminolyse zu Hydrolyse, was letztlich in einer verringerten Ausbeute an Aminolyseprodukt resultiert. Dabei gilt jedoch, desto höher die Syntheseeffizienz einer Variante ist und somit das Verhältnis von Aminolyse zu Hydrolyse, umso kleiner fällt die Differenz in der Ausbeute zwischen hoher und niedriger Substratkonzentration aus, da die Verringerung des Verhältnisses umso besser kompensiert werden kann, desto höher der Startwert bei hoher Substratkonzentration ist. So liegt bei Variante 1C11 mit der Erkennungssequenz LRH und einer hohen Substratkonzentration (250 μM) ein Verhältnis von Aminolyse zu Hydrolyse von 352,3 (siehe Tabelle 20) vor, während dieser Wert bei 1C11 mit YRH 61,7 und bei Trypsiligase mit YRH 3,2 erreicht (siehe Tabelle 19). Diese Tendenz spiegelt sich auch in den jeweiligen Syntheseprofilen und den Differenzen zwischen den erreichten Ausbeuten bei hoher und niedriger Substratkonzentration wider.

Ergänzend zur enzymkinetischen Charakterisierung sollte auch die Abhängigkeit der mittels 1C11 katalysierten Transamidierung von der Zinkionen-Konzentration und dem pH-Wert untersucht werden. Hierzu wurden Transamidierungsstudien, wie unter 3.6.4 und 3.6.5 beschrieben, durchgeführt. Da auch anhand der Syntheseprofile (siehe Abbildung 13) die hohe Effizienz unter Verwendung der Erkennungssequenz LRH bestätigt werden konnte, wurde das Substrat-Peptid Bz-AAL-RHAAG-OH für diese Untersuchungen eingesetzt. Dabei wurde das Substrat-Peptid in einer Konzentration von 600 µM verwendet, was entsprechend nahe am ermittelten K_M -Wert für dieses Substrat von 639,6 µM (siehe auch Tabelle 22) lag und so die Sensitivität der Messungen erhöhen sollte. Das Nukleophil-Peptid H-RHAK-OH wurde jeweils in einer Konzentration von 1200 µM eingesetzt, was also einem zweifachen Überschuss entsprach.

Die Ergebnisse zur Abhängigkeit von der Zinkionen-Konzentration sind in Kapitel 4.6.3 zusammengefasst, wobei in Abbildung 14 die apparenten Wechselzahlen der Aminolyseaktivität gegen die eingesetzte Zinkionen-Konzentration aufgetragen sind. Anhand dieser Daten konnte eine deutliche Abhängigkeit der Aminolyseaktivität von der Konzentration an Zink-Ionen nachgewiesen werden. So war die initiale Aminolysegeschwindigkeit ohne hinzugefügtes Zinkchlorid um einen Faktor von ca. 27 kleiner, in Bezug auf den Reaktionsansatz dem 100 µM Zinkchlorid zugesetzt wurden. Eine Abhängigkeit ähnlichen Ausmaßes konnte auch für die Trypsiligase-Variante 2G10 beobachtet werden, wobei hier ein Faktor von ca. 50 zwischen 0 µM und 100 µM Zinkchlorid lag. Für Variante 2G10 wurde zusätzlich auch der Einfluss der Zinkionen-Konzentration auf die Hydrolyseaktivität bestimmt, welcher mit einem Faktor von ca. 2 deutlich geringer ausfiel (Böhme, 2021). Die Hydrolyseaktivität in Abhängigkeit von der Zinkionen-Konzentration konnte anhand der für Variante 1C11 generierten Daten jedoch nicht bestimmt werden, da aufgrund der geringen Hydrolyseaktivität das Hydrolyseprodukt im beobachteten Reaktionszeitraum von 10 min nicht quantifiziert werden konnte. Hier wären dementsprechend deutlich längere Inkubationszeiten notwendig gewesen. Die ausgeprägte Abhängigkeit der Aminolyseaktivität der Trypsiligase-Varianten 1C11 und 2G10 von der Zinkionen-Konzentration entspricht hier auch dem Erwartungswert. Schließlich sind die Zink-Ionen sowohl an der Einbindung der

Substrat-Peptide mit YRH bzw. LRH Erkennungssequenz beteiligt, als auch an den Wechselwirkungen zwischen Enzym und den Nukleophil-Peptiden mit *N*-terminalem RH-Motiv. Diese Interaktionen beruhen auf den Mutationen N143H und N151H der Trypsiligase. Durch diese Histidinseitenketten in der S2'-Bindetasche wird eine Komplexierung mit zweiwertigen Metallionen (Zink-Ionen) und der Histidinseitenkette von Substrat- oder Nukleophil-Peptid in P2'-Position ermöglicht (Liebscher, Schöpfel, et al., 2014). Dementsprechend hat diese Komplexierung einen Einfluss auf die Affinität der Trypsiligase-Varianten für Substrate mit Histidin in P2'-Position, welche bei fehlenden Zink-Ionen folglich gesenkt ist.

In Abbildung 15 (siehe Kapitel 4.6.4) sind die Ergebnisse der Transamidierungsstudien zur Abhängigkeit der Katalyse mittels Trypsiligase-Variante 1C11 vom pH-Wert dargestellt. Hier wurden die apparenten Wechselzahlen der Aminolyse und Hydrolyse sowie die jeweils erreichten maximalen Ausbeuten bestimmt und zusätzlich der Quotient der apparenten Wechselzahlen berechnet. Diese Messungen wurde entsprechend unter Variation des pH-Wertes durchgeführt, wobei diese Analyse auf den Pufferbereich von HEPES als Good-Puffer mit 6,6-8,4 beschränkt wurde (Good et al., 1966), um sekundäre Effekte durch Wechsel des Puffersystem ausschließen zu können. Wie bereits im Zuge der Analysen zur Abhängigkeit von der Zinkionen-Konzentration wurde auch hier eine Konzentration an Substrat-Peptid von 600 µM und ein zweifacher Überschuss an Nukleophil-Peptid gewählt, um eine hohe Sensitivität der Messungen zu gewährleisten.

Zusammenfassend konnte anhand der generierten Daten eine relativ geringe Abhängigkeit der 1C11-katalysierten Transamidierung vom pH-Wert festgestellt werden. So sank die Aminolyseaktivität zwischen den pH-Werten 6,6 und 8,4 um ca. 44 %, während die Hydrolyseaktivität ein schwach ausgeprägtes Maximum bei einem pH-Wert von 8,2 zeigte. Die Quotienten der apparenten Wechselzahlen von Aminolyse zu Hydrolyse schwankten dementsprechend zwischen Werten von 319,0-777,8. Da damit die Aminolyseaktivität im betrachteten pH-Bereich immer mindestens 300-fach größer war als die Hydrolyseaktivität, konnte hier kein Einfluss auf die maximalen Ausbeuten festgestellt werden, was wiederum auf die hohe Syntheseeffizienz der Variante 1C11 zurückzuführen ist. Insbesondere hinsichtlich der praktischen bzw. großtechnischen Anwendung der Variante 1C11 ist

eine gewisse Toleranz gegenüber Abweichungen im pH-Wert von Vorteil, da so konsistente Produktionsergebnisse erzielt werden können.

Während in Kapitel 5.3 bereits diskutiert wurde, welche Mutationen einen Beitrag zur optimierten Syntheseeffizienz der Variante 1C11 lieferten, bleibt die Frage offen, auf welchen Effekten diese Optimierungen beruhen. Auf Grundlage der detaillierten, enzymkinetischen Charakterisierung von Variante 1C11 und dem bereits erwähnten Einfluss der Mutation S214G auf die Hydrolyseaktivität (Simon, 2018) kann geschlussfolgert werden, dass die hohe Syntheseeffizienz im Mechanismus der Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediats begründet ist. So ist für die Position 214 beschrieben, dass die Serin-Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung zu Aspartat 102 ausbildet und einen erheblichen Einfluss auf die polare Umgebung dieser Position hat (McGrath et al., 1992). Aspartat 102 wiederrum koordiniert über eine Wasserstoffbrückenbindung das Histidin 57 und erhöht den pK_s -Wert des Nε2-Atoms im Imidazolring, wodurch Histidin 57 als Base fungieren und sowohl die Serin-Seitenkette als auch die Wassermoleküle für einen nukleophilen Angriff aktivieren kann. Durch die Mutation S214G würde die Wasserstoffbrückenbindung zu Aspartat 102 fehlen, was auch die polare Umgebung und damit die Elektrostatik verändern könnte. Dadurch könnte wiederrum die aktivierende und stabilisierende Wirkung auf Histidin 57 verringert sein, was dessen Funktion als Base beeinträchtigen würde. Die Folge wäre eine reduzierte Aktivierung der Seitenkette von Serin 195 und des katalytisch aktiven Wassermoleküls, wodurch sowohl die Acylierungsgeschwindigkeit als auch die Deacylierungsgeschwindigkeit der Hydrolyse sinken würde. Die Deacylierung durch Aminolyse wäre von diesem Effekt jedoch nur in geringem Ausmaß betroffen, da der pK_s -Wert der α-Aminogruppe am N-Terminus des Nukleophil-Peptides mit ca. 7-9 (Grimsley et al., 2009; Thurlkill et al., 2006) bereits wesentlich geringer als der pK_s -Wert von Wasser mit 15,7 ist. Dementsprechend ist die Aminolyse in geringerem Maße von der Aktivierung durch Histidin 57 abhängig, was wiederrum dazu führt, dass eine verringerte Basizität von Histidin 57 ein erhöhtes Verhältnis von Aminolyse zu Hydrolyse und damit eine erhöhte Syntheseeffizienz zur Folge hätte. Auf diese Kausalität hat auch Herr Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)) im Rahmen seiner Dissertation hingewiesen und als Grund für die

verbesserte Syntheseeffizienz der Trypsiligase-Variante 2G10 angeführt. Dabei hatte er einen direkten Einfluss der Mutation A55S auf die Basenfunktion von Histidin 57 diskutiert.

Neben der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette von Serin 214 und dem Aspartat 102 ist in der Literatur eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonyl-Funktion im Peptidrückgrat von Serin 214 und dem Histidin 57 beschrieben (Derewenda et al., 1994). Dementsprechend könnte die Mutation S214G also auch einen direkten Einfluss auf die Koordination von Histidin 57 haben. Zudem liegen die Seitenketten von Leucin 99 und Arginin 96 in räumlicher Nähe zu Aspartat 102 (siehe Abbildung 5), wonach die Mutationen L99F und R96V hier ebenfalls einen Einfluss auf die polare Umgebung haben könnten und den Effekt durch die Mutation S214G eventuell potenzieren. Zudem ragt die Seitenkette der Position 99 relativ weit in das aktive Zentrum. Die Mutation L99F hätte hier zum einen das Potential, die Koordinierung des katalytisch aktiven Wassermoleküls im aktiven Zentrum zu stören oder auch durch Interaktionen mit dem P1- bis P2-Bereich des Substrates die Geometrie des Acyl-Enzym-Intermediates zu verändern. Für beide Faktoren ist in der Literatur beschrieben, dass sie einen Einfluss auf die Deacylierungsgeschwindigkeit der Hydrolyse haben können (Hedstrom, 2002; Radisky et al., 2006). Zudem ist in der Literatur auch eine Spezifitäts-determinierende Rolle der Position 99 auf den S2-S3-Bereich von Trypsin- bzw. Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen beschrieben, was auf eine Interaktion der Seitenkette dieser Position mit dem P2-P3-Bereich des Substrates zurückgeführt wird (Mikhailova et al., 2004).

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten können wiederrum nur Hinweise auf die strukturellen bzw. mechanistischen Ursachen der gesteigerten Syntheseeffizienz geben. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten von Acylierung und Deacylierung der Aminolyse und Hydrolyse würde auch hier helfen, die mechanistischen Ursachen einzugrenzen. Insbesondere ein Vergleich dieser Geschwindigkeitskonstanten von Trypsiligase als Ausgangsviariante mit Variante 1C11 wäre hier zielführend. Außerdem wäre es denkbar, die 1C11-katalysierte Transamidierung bei sehr hohen pH-Werten zu analysieren. Dadurch sollte der Unterschied in den pK_s -Werten zwischen peptidischem Nukleophil und Wasser nivelliert werden,

was auch den Effekt der verringerten Polarität von Aspartat 102 negieren sollte. So sollte die Syntheseeffizienz bei hohen pH-Werten vergleichsweise niedrig sein, wenn die hier diskutierte These zutreffend sein sollte. Dabei ist jedoch fraglich, ob die Stabilität von Variante 1C11 bei diesen hohen pH-Werten gewährleistet ist oder ob andere sekundäre Effekte die Syntheseeffizienz senken. Des Weiteren könnte eine strukturaufklärende Methode wie die Röntgenkristallographie Informationen zu strukturellen Änderungen im aktiven Zentrum liefern (Pearson & Owen, 2009). Insbesondere Strukturen von Acyl-Enzym-Intermediaten oder anderen Übergangszustand-Analoga könnten hier hilfreich sein. Mittels NMR-Spektroskopie und vergleichenden Analysen zwischen Trypsilicase und Variante 1C11 könnten auch Änderungen in den Interaktionen zwischen Enzym und Substrat/Nukleophil detektiert werden (Palmer, 2015), welche hier ursächlich für die gesteigerte Syntheseeffizienz sind.

5.6 Validierung der praktischen Anwendbarkeit von Variante 1C11

Als finaler Bestandteil dieser Arbeit sollte auch die Anwendbarkeit der Trypsilicase-Variante 1C11 für die ortsspezifische Proteinmodifikation anhand eines praxisorientierten Beispiels validiert werden. Diese Validierung sollte auch Aufschluss darüber geben, inwieweit die unter Verwendung von Modellpeptiden generierten Daten auf die Proteinmodifikation übertragbar sind. Als Anwendungsbeispiel bzw. Modellprotein wurde hier das Fab-Fragment eines Antikörpers gewählt, da die enzymatische Herstellung von ADCs immer bedeutender für die Entwicklung dieser Therapeutika wird. So bestehen viele ADCs in klinischen Studien aus heterogenen Mischungen verschiedener Spezies, was negative Konsequenzen für die Wirksamkeit und Sicherheit dieser Präparate hat (Chudasama et al., 2016). Aufgrund der intrinsischen Eigenschaften von Enzymen bietet sich deren Verwendung zur ortsspezifischen Modifikation von Antikörpern oder Antikörper-Fragmenten an, um homogene Produkte zu generieren. Die Validierung unter Verwendung eines Fab-Fragments eignete sich zudem, da Fab-Fragmente rekombinant in *E. coli* hergestellt werden können und ein vergleichsweise komplexes Modellprotein darstellen. Fünf Disulfidbrücken, zwei Polypeptidketten und demzufolge jeweils zwei *N*- und *C*-Termini machen eine ortsspezifische Modifizierung anspruchsvoll, was die

Aussagekraft einer entsprechenden Validierung erhöht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fab-Fragment des Her2/neu-spezifischen Antikörpers Trastuzumab verwendet, welcher für die Behandlung von Her2-positivem Brustkrebs zugelassen ist (Garnock-Jones et al., 2010). Auf Grundlage von Trastuzumab wurden zudem die ADCs Kadcyla® (Trastuzumab-Emtansin (Lambert & Chari, 2014)) und EnherTU® (Trastuzumab-Deruxtecan (Tamura et al., 2019)) entwickelt, welche ebenfalls für die Behandlung von Her2-positivem Brustkrebs zugelassen sind.

Um das Her2-spezifische Fab-Fragment von Trastuzumab für die 1C11-katalysierte Transamidierung verwenden zu können, wurde es am C-Terminus der schweren Kette um die Aminosäuresequenz H-TAAYRHAAGEQKLISEEDL-OH bzw. H-TAALRHAAGEQKLISEEDL-OH mittels genetischer Modifikation verlängert. Dementsprechend wurden hier zwei verschiedene Fab-Fragmente, welche sich in der Erkennungssequenz unterschieden (YRH oder LRH), generiert. Die Aminosäuresequenz H-EQKLISEEDL-OH entspricht dem cmyc-Tag und wurde zusätzlich angefügt, um das Fab-Fragment als Edukt bei Bedarf mittels ELISA nachweisen zu können (Hilpert et al., 2001). Die Biosynthese und Reinigung des Fab-Fragments α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, was in den Kapiteln 3.2.2 und 3.3.1 detailliert beschrieben ist. Die Ergebnisse der Reinigung und der dazugehörigen Analytik sind in Kapitel 4.7.1 zusammengefasst. Das Fab-Fragment α Her2-Fab-TAALRH-cmyc wurde nach identischem Protokoll im Zuge der Masterarbeit von Frau Julia Simon (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Simon, 2018)) hergestellt. Beide Präparationen der Fab-Fragmente wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit mittels LC/MS-Analytik untersucht (siehe Abbildung 17). Dabei konnten die Identität und Integrität der Fab-Fragmente anhand der Übereinstimmung der berechneten und gemessenen Molekulargewichte bestätigt werden. In beiden Präparationen konnten jedoch auch Proteinspezies mit einem Molekulargewicht von 47664 Da bzw. 47734 Da identifiziert werden, welche den Abbauprodukten α Her2-Fab-TA-OH und α Her2-Fab-TAA-OH entsprechen würden. Hier kann von einer unspezifischen, proteolytischen Degradation der Fab-Fragmente durch *E. coli*-eigene Proteasen ausgegangen werden (Maurizi, 1992). Zwar wurde dem Zellaufschlusspuffer (siehe 2.9) AEBSF als Inhibitor von Serinproteasen zugesetzt, was jedoch nicht

die proteolytische Degradation während der Biosynthese oder z.B. durch Metalloproteasen verhindert. Anhand der relativen Signalintensitäten dieser Proteinspezies konnte deren prozentualer Anteil auf unter 5 % bestimmt werden, womit der Anteil dieser Abbauprodukte vernachlässigbar klein war. Hier ist jedoch zu beachten, dass die effektive Substratkonzentration bei Verwendung dieser Fab-Fragmente für Transamidierungsstudien minimal verringert ist, da die Abbauprodukte der Fab-Fragmente auch in die Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektroskopie (siehe 3.3.3) eingehen, aber nicht mehr über die Erkennungssequenz für Trypsilicase bzw. 1C11 verfügen und somit nicht als Substrat fungieren können. Schließlich wurden unter Verwendung der Fab-Fragmente Transamidierungsstudien, wie in Kapitel 3.7 beschrieben, durchgeführt. Zu Vergleichszwecken wurden Nukleophil-Peptide mit unterschiedlichen Funktionalitäten verwendet. So wurde zum einen das Peptid H-RHAK(FAM)-OH eingesetzt, welches über die ε-Aminogruppe der Lysin-Seitenkette mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluorescein modifiziert war. Zum anderen wurde das Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH verwendet, welches ebenfalls über die Lysin-Seitenkette mit Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (MCC) als Linker-Molekül und dem Toxin DM1 (Mertansin) funktionalisiert war. Die Kombination aus dem Her2-spezifischen Fab-Fragment von Trastuzumab und dem Toxin DM1 ist dabei dem ADC Kadcyla® nachempfunden. Um auch hier die gesteigerte Syntheseeffizienz von Variante 1C11 demonstrieren und bestätigen zu können, wurden Trypsilicase-katalysierte Transamidierungen unter Verwendung des Fab-Fragmentes αHer2-Fab-TAAYRH-cmcy zum Vergleich mitgeführt. Anhand der in Abbildung 18 (siehe Kapitel 4.7.2) dargestellten Progresskurven der Modifizierung der Fab-Fragmente mit dem Nukleophil-Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH wird die Optimierung der Variante 1C11 hinsichtlich der erzielten Produktausbeute deutlich ersichtlich. Unter den angewendeten Reaktionsbedingungen (100 μM Fab-Fragment; 500 μM Nukleophil-Peptid (fünffacher Überschuss)) erreichte Variante 1C11 mit dem Fab-Fragment αHer2-Fab-TAALRH-cmcy (Grün) eine maximale Ausbeute von 76,4 % und mit αHer2-Fab-TAAYRH-cmcy (Blau) 72,7 %. Die Trypsilicase (Rot) erreichte unter gleichen Bedingungen lediglich eine Ausbeute von 38,1 %. Somit konnte die Ausbeute durch die Generierung von Variante 1C11 verdoppelt werden und lag

damit nahe an der thermodynamisch maximal möglichen Ausbeute von 83,3 %, welche bei dem eingesetzten fünffachen Überschuss an Nukleophil erreicht werden kann (siehe auch Kapitel 5.5). Die verringerte Hydrolyseaktivität mündete hier zudem auch in einer geringeren Sekundärhydrolyse des Aminolyseproduktes, wodurch nach Erreichen der maximalen Ausbeute der prozentuale Anteil an Aminolyseprodukt relativ stabil blieb. Insbesondere in der großtechnischen Anwendung von Variante 1C11 ist dieser Umstand von erheblichem Vorteil, da der Ausbeuteverlust durch diese Produktdegradation gering ausfällt, selbst wenn einzelne Schritte im Produktionsprozess mehr Zeit beanspruchen als im Labormaßstab.

Zusätzlich zu den Progresskurven in Abbildung 18 wurden die mittels 1C11 katalysierten Transamidierungsreaktionen unter Verwendung der Fab-Fragmente und den Nukleophil-Peptiden H-RHAK(FAM)-OH bzw. H-RHAK(MCC-DM1)-OH auch anhand einer LC/MS-Analytik untersucht (siehe Abbildung 19). Dabei sollte diese Analytik primär dazu dienen, die Entstehung unerwarteter Nebenprodukte auszuschließen und dementsprechend auch die ortsgerechtete Modifizierung mittels 1C11 an der Erkennungssequenz zu bestätigen. So konnten anhand der generierten Spektren die erwarteten Peaks bzw. berechneten Molekulargewichte für die Fab-Fragmente als Edukte (Peak 1), die Aminolyseprodukte (Peak 2) und Hydrolyseprodukte (Peak 3) identifiziert werden. Neben diesen drei Spezies wurden hier auch die aufgrund einer unspezifischen, proteolytischen Degradation verkürzten Fab-Fragmente wiedergefunden (zwischen 47600-47800 Da), deren Identifikation bereits im Zusammenhang mit der Herstellung der Fab-Fragmente erwähnt wurde. Anhand der LC/MS-Analytik konnte dabei auch gezeigt werden, dass diese Degradationsprodukte bereits zum Start der Transamidierungsreaktion vorhanden waren (0 min; blaue Spektren) und die relativen Signalintensitäten dieser beiden Spezies im Verlauf der Reaktion unverändert blieben. So konnte bewiesen werden, dass diese verkürzten Spezies weder Produkt noch Edukt der Transamidierungsreaktion waren. Außerdem konnte anhand der Massenspektren ein deutlich höherer Anteil an Hydrolyseprodukt nach 60 min Reaktionszeit (grüne Spektren) bei der Modifizierung des Fab-Fragments mit YRH-Erkennungssequenz (Abbildung 19A-B) im Vergleich zur LRH-Erkennungssequenz (Abbildung 19C-D) detektiert werden. Dieser Unterschied lag wiederrum in den Verhältnissen von Aminolyse-

zu Hydrolyseaktivität zwischen den beiden Erkennungssequenzen der Variante 1C11 begründet (siehe Tabelle 20), welcher sich auch in der Fab-Modifizierung wiederfand und zu der geringeren maximalen Ausbeute sowie stärkeren Abnahme an Aminolyseprodukt durch die Sekundärhydrolyse bei Verwendung der YRH-Erkennungssequenz führte (siehe Abbildung 18).

Die wesentliche Funktion eines Antikörpers als Teil eines ADC ist die spezifische Bindung der Zielstruktur bzw. des Krebs-assoziierten Rezeptors, wodurch der Wirkstoff gezielt zum Wirkort geleitet werden soll. Dementsprechend ist ein wichtiges Kriterium der Konjugationstechnologie, welche zur Herstellung eines ADC verwendet werden soll, dass diese Bindungsfunktionalität nicht beeinflusst wird. Aus diesem Grund sollte auch im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob die Affinität der Fab-Fragmente für die humane Ektodomäne des Her2-Rezeptors durch die 1C11-katalysierte Modifizierung beeinflusst wird. So wurden, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, die Fab-Fragmente α Her2-Fab-TAAYRH-cmyc und α Her2-Fab-TAALRH-cmyc mit dem Nukleophil-Peptid H-RHAK(MCC-DM1)-OH unter enzymatischer Katalyse mittels Variante 1C11 modifiziert und für einen konzentrationsabhängigen ELISA eingesetzt. Dabei wurden die nicht-modifizierten Fab-Fragmente im ELISA als Referenzen mitgeführt. In Abbildung 20 (siehe Kapitel 4.7.3) ist die Auftragung der Signalintensitäten gegen die Konzentration dargestellt, anhand derer unter Verwendung einer logistischen Vier-Parameter-Regression (durchgezogene und gestrichelte Linien) die Dissoziationskonstanten (K_D) als Maß für die Bindungsaffinität bestimmt wurden. Für die nicht-modifizierten Fab-Fragmente wurden so K_D -Werte von 226 pM (YRH) bzw. 364 pM (LRH) ermittelt, während die mittels 1C11 modifizierten Fab-Fragmente sehr ähnliche K_D -Werte von 207 pM (YRH) und 341 pM (LRH) zeigten. Dementsprechend konnte hier keine Veränderung der Bindungsfunktionalität durch die Modifizierung mittels 1C11 ausgemacht werden. Die Genauigkeit bzw. Korrektheit der ermittelten K_D -Werte wird zudem dadurch bestätigt, dass für ähnliche, Her2-spezifische Fab-Fragmente mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie Werte im Bereich von 110-442 pM bestimmt wurden (Liebscher, Kornberger, et al., 2014; Voigt et al., 2022).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die ortsgerichtete Modifizierung von Proteinen ist für eine Vielzahl von Anwendungen in den Bereichen Therapeutika und Diagnostik von großem Interesse. Antikörper-Wirkstoff-Konjugate sind ein prominentes Beispiel für die Herstellung solcher Biomoleküle. Die hohe Komplexität von Antikörpern macht die Herstellung von homogenen und wohldefinierten Produkten zu einer Herausforderung. Aufgrund ihrer intrinsischen Chemo- und Regioselektivität sind biokatalytische Technologien für diese anspruchsvolle Aufgabe prädestiniert. So wurde die Trypsilige entwickelt, um diesen Bedarf zu adressieren. Während die N-terminale Modifikation unter Verwendung der Trypsilige quantitative Ausbeuten liefert, ist die C-terminale Modifikation jedoch vergleichsweise ineffizient, was auf die verbliebene native Hydrolyseaktivität von Trypsin zurückzuführen ist. Dadurch sind die Einsatzmöglichkeiten der Trypsilige limitiert.

Um dieser Limitation zu begegnen, sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Trypsilige für die C-terminale Modifikation von Proteinen optimiert werden. Hierfür sollte ein semi-rationales Enzymdesign, bestehend aus der Generierung einer randomisierten Bibliothek, dem Phagen-Display als Selektionssystem und einem ELISA-basierten Hochdurchsatzscreening, angewendet werden. Das Bibliotheksdesign sah die Randomisierung der Positionen Asp95, Arg96, Leu99, Ser214, Gly219 und Ala221 vor und basierte auf der Verwendung von Nukleosid-Trimer-Phosphoramiditen in Kombination mit einer Leserahmenselektion, wodurch eine Bibliothek von sehr hoher Qualität generiert werden konnte. Im Zuge des anschließenden Phagen-Displays wurden insgesamt vier Selektionsrunden durchgeführt, wobei der Selektionsdruck von Runde zu Runde erhöht wurde. Für das folgende Screening wurde im Rahmen dieser Arbeit die Herstellung von Trypsilige bzw. Trypsilige-Varianten im MTP-Format validiert, was mittels Biosynthese in *P. pastoris* X33 erfolgte. So wurden 368 Einzelvarianten aus der angereicherten Bibliothek im MTP-Format exprimiert und mittels ELISA-basierten Screening hinsichtlich der Syntheseeffizienz durchmustert. Anhand der primären Charakterisierung der im Screening erhaltenen Treffer wurden schließlich acht Varianten identifiziert, welche allesamt eine im Vergleich zu Trypsilige gesteigerte Syntheseefizienz zeigten. Dabei resultierten die Varianten 1C11 und 4F8 als die

effizientesten Biokatalysatoren. Im Zuge der detaillierten, enzymkinetischen Charakterisierung von Variante 1C11 (R96V, L99F, S214G, G219S, A221G) konnte eine hohe Spezifität für die Erkennungssequenz LRH gezeigt werden, wodurch bei Verwendung dieser Erkennungssequenz die Syntheseeffizienz weiter gesteigert werden konnte. Dabei lagen die erreichten Produktausbeuten sehr nahe an den thermodynamisch maximal möglichen und änderten sich über den eingesetzten Konzentrationsbereich an Substrat nur geringfügig. Die beträchtliche Erhöhung der Syntheseeffizienz konnte auf das um zwei Größenordnungen gesteigerte Verhältnis von Aminolyse- zu Hydrolyseaktivität zurückgeführt werden, was in erster Linie auf die stark verringerte Hydrolyseaktivität zurück ging. Aber auch der um den Faktor 6 erhöhte Quotient k_{cat}/K_M veranschaulichte die Steigerung der katalytischen Effizienz. Diese Optimierung der Trypsilгазe in Form von Variante 1C11 ließ sich schließlich auch auf die Modifikation eines Fab-Fragmentes als praxisorientiertes Anwendungsbeispiel überführen. So konnte die Ausbeute der ortsspezifischen Modifikation verdoppelt werden, ohne dass Nebenprodukte detektierbar waren oder die Bindungsfunktionalität der Fab-Fragmente beeinflusst wurde.

Die im Zuge der Charakterisierung von Variante 1C11 generierten Daten lieferten auch Hinweise auf den Beitrag der eingeführten Mutationen zur Steigerung der Syntheseeffizienz sowie mögliche strukturelle und mechanistische Ursachen dieser Optimierung. Weiterführende Arbeiten zur Aufklärung dieser Punkte wurden bereits im Zuge der Masterarbeit von Frau Julia Simon (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Simon, 2018)) durchgeführt. Um hier jedoch zuverlässige Aussagen treffen zu können, wären weitere Studien notwendig. Insbesondere die Strukturaufklärung von Variante 1C11 mittels Röntgenkristallographie wäre hier zielführend. Die Verwendung von Übergangszustand-Analoga oder stabilen Acyl-Enzym-Intermediaten könnte dabei Informationen zu Änderungen im aktiven Zentrum im Vergleich zu Trypsilгазe liefern. Zudem könnte die Bestimmung der Teilkonstanten von Acylierung und Deacylierung die in dieser Arbeit getroffenen Annahmen bestätigen.

Da die in dieser Arbeit generierte Variante 1C11 und Variante 2G10, welche als beste Variante aus der Promotionsarbeit von Herrn Dr. Marcus Böhme (AG Bordusa, MLU Halle-Wittenberg (Böhme, 2021)) resultierte, lediglich in einer

Mutation (L99F) identisch waren, wurde in weiterführenden Arbeiten zudem untersucht, ob die Kombination der Mutationen beider Enzyme in einer Hybridvariante von 1C11 und 2G10 zu einer weiteren Steigerung der Syntheseeffizienz führten (Schulze, 2015). Die Aminolyseaktivität der als Tn1_BW bezeichnete Hybridvariante war im Vergleich zu 1C11 und 2G10 leicht gesenkt (Faktor 1,6-6,2), während die Hydrolyseaktivität um mindestens eine Größenordnung niedriger war (Faktor 10-79). Dieses erhöhte Verhältnis von Aminolyse zu Hydrolyse resultierte auch hier in einer Steigerung der Syntheseeffizienz unter Verwendung der Erkennungssequenz YRH. Dementsprechend lag hier ein additiver bzw. synergistischer Effekt durch Kombination der Mutationen beider Varianten vor. Für Variante 1C11 wurde in Kapitel 5.5 als Grund für die Optimierung eine durch die eingeführten Mutationen verringerte Polarität von Aspartat 102 diskutiert, wodurch letztlich die Basizität von Histidin 57 gesenkt wird. Einen ähnlichen Effekt hat Herr Dr. Böhme für Variante 2G10 diskutiert, wobei die Mutation A55S für eine verringerte Basizität von Histidin 57 verantwortlich sein soll. Das Zusammenführen der Mutationen in Variante Tn1_BW könnte diese Effekte schließlich additiv wirken lassen, wodurch die Basizität von Histidin 57 noch weiter gesenkt wurde. Dass sowohl die Aminolyse- als auch die Hydrolyseaktivität von Tn1_BW niedriger war, spricht für diese Annahme, da durch die verringerte Basizität sowohl die Aktivierung von Serin 195 als auch des katalytisch aktiven Wassermoleküls erschwert wird. Von diesem Effekt ist die Hydrolyseaktivität jedoch in größerem Ausmaß betroffen, was bereits detailliert in Kapitel 5.5 diskutiert wurde.

Die Varianten 1C11 und 2G10 legten letztlich den Grundstein für eine weitere Entwicklung von Trypsiligase-Varianten. Der zusätzliche Erfolg durch die Hybridvariante Tn1_BW mündete schließlich in einem anwendungsorientierten Kooperationsprojekt zwischen der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der BioPharma Translationsinstitut Dessau Forschungs GmbH. Dabei wurde das etablierte, semi-rationale Enzymdesign auf die Generierung weiterer Trypsiligase-Varianten übertragen, um effiziente Biokatalysatoren für die Herstellung homogener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate zu erhalten. Aus diesen Arbeiten resultierten zwei internationale Patentanmeldungen (WO2020094840 und WO2020127808).

7 Literaturverzeichnis

- Aehle, W. (2007). Enzymes in Industry. In W. Aehle (Ed.), *Processing*. Wiley.
- Agarwal, P., Kudirka, R., Albers, A. E., Barfield, R. M., de Hart, G. W., Drake, P. M., Jones, L. C., & Rabuka, D. (2013). Hydrazino-Pictet-Spengler Ligation as a Biocompatible Method for the Generation of Stable Protein Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 24(6), 846–851.
- Agresti, J. J., Antipov, E., Abate, A. R., Ahn, K., Rowat, A. C., Baret, J.-C., Marquez, M., Klibanov, A. M., Griffiths, A. D., & Weitz, D. A. (2010). Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4004–4009.
- Aguirre, C., Condado-Morales, I., Olguin, L. F., & Costas, M. (2015). Isothermal titration calorimetry determination of individual rate constants of trypsin catalytic activity. *Analytical Biochemistry*, 479, 18–27.
- Aharoni, A., Griffiths, A. D., & Tawfik, D. S. (2005). High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2), 210–216.
- Aharoni, A., Thieme, K., Chiu, C. P. C., Buchini, S., Lairson, L. L., Chen, H., Strynadka, N. C. J., Wakarchuk, W. W., & Withers, S. G. (2006). High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nature Methods*, 3(8), 609–614.
- Ahn, S. H., Vaughn, B. A., Solis, W. A., Luper, M. L., Hallam, T. J., & Boros, E. (2020). Site-Specific ⁸⁹Zr- and ¹¹¹In-Radiolabeling and In Vivo Evaluation of Glycan-free Antibodies by Azide-Alkyne Cycloaddition with a Non-natural Amino Acid. *Bioconjugate Chemistry*, 31(4), 1177–1187.
- Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C., & Plückthun, A. (2001). In vitro display technologies: novel developments and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(4), 400–405.
- Amstutz, P., Pelletier, J. N., Guggisberg, A., Jermutus, L., Cesaro-Tadic, S., Zahnd, C., & Plückthun, A. (2002). In Vitro Selection for Catalytic Activity with Ribosome Display. *Journal of the American Chemical Society*, 124(32), 9396–9403.
- Anand, T., Virmani, N., Bera, B. C., Vaid, R. K., Vashisth, M., Bardajaty, P., Kumar, A., & Tripathi, B. N. (2021). Phage Display Technique as a Tool for Diagnosis and Antibody Selection for Coronaviruses. *Current Microbiology*, 78(4), 1124–1134.
- Anastas, P. T., & Warner, J. C. (1998). Green chemistry: Theory and Practice. *Oxford University Press*.
- Appel, W. (1986). Chymotrypsin: Molecular and catalytic properties. *Clinical Biochemistry*, 19(6), 317–322.
- Arnold, F. H. (2018). Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(16), 4143–4148.
- Arnold, F. H., & Moore, J. C. (1997). Optimizing industrial enzymes by directed evolution. In *New Enzymes for Organic Synthesis. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (vol 58, pp. 1–14). Springer Berlin Heidelberg.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K.,

- Redaschi, N., Rossier, G., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 597–603.
- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2010). ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server), W529–W533.
- Atwell, S., & Wells, J. A. (1999). Selection for improved subtiligases by phage display. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), 9497–9502.
- Axup, J. Y., Bajjuri, K. M., Ritland, M., Hutchins, B. M., Kim, C. H., Kazane, S. A., Halder, R., Forsyth, J. S., Santidrian, A. F., Stafin, K., Lu, Y., Tran, H., Seller, A. J., Biroc, S. L., Szydlik, A., Pinkstaff, J. K., Tian, F., Sinha, S. C., Felding-Habermann, B., ... Schultz, P. G. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 16101–16106.
- Baalmann, M., Neises, L., Bitsch, S., Schneider, H., Deweid, L., Werther, P., Ilkenhans, N., Wolfring, M., Ziegler, M. J., Wilhelm, J., Kolmar, H., & Wombacher, R. (2020). A Bioorthogonal Click Chemistry Toolbox for Targeted Synthesis of Branched and Well-Defined Protein-Protein Conjugates. *Angewandte Chemie*, 132(31), 12985–12993.
- Badescu, G., Bryant, P., Bird, M., Henseleit, K., Swierkosz, J., Parekh, V., Tommasi, R., Pawlisz, E., Jurlewicz, K., Farys, M., Camper, N., Sheng, X., Fisher, M., Grygorash, R., Kyle, A., Abhilash, A., Frigerio, M., Edwards, J., & Godwin, A. (2014). Bridging Disulfides for Stable and Defined Antibody Drug Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 25(6), 1124–1136.
- Baker, K., Bleczinski, C., Lin, H., Salazar-Jimenez, G., Sengupta, D., Krane, S., & Cornish, V. W. (2002). Chemical complementation: A reaction-independent genetic assay for enzyme catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16537–16542.
- Baker, M. (2011). Protein engineering: navigating between chance and reason. *Nature Methods*, 8(8), 623–626.
- Barfield, R. M., Kim, Y. C., Chuprakov, S., Zhang, F., Bauzon, M., Ogunkoya, A. O., Yeo, D., Hickle, C., Pegram, M. D., Rabuka, D., & Drake, P. M. (2020). A Novel HER2-targeted Antibody-drug Conjugate Offers the Possibility of Clinical Dosing at Trastuzumab-equivalent Exposure Levels. *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(9), 1866–1874.
- Barman, T. E., Bellamy, S. R. W., Gutfreund, H., Halford, S. E., & Lionne, C. (2006). The identification of chemical intermediates in enzyme catalysis by the rapid quench-flow technique. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(22), 2571–2583.
- Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., & Corvaïa, N. (2017). Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(5), 315–337.
- Becker, S., Hübenreich, H., Vogel, A., Knorr, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K. E., Reetz, M. T., & Kolmar, H. (2008). Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. *Angewandte Chemie - International Edition*, 47(27), 5085–5088.
- Becker, S., Schmoldt, H.-U., Adams, T. M., Wilhelm, S., & Kolmar, H. (2004). Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts.

- Current Opinion in Biotechnology*, 15(4), 323–329.
- Behrens, C. R., Ha, E. H., Chinn, L. L., Bowers, S., Probst, G., Fitch-Bruhns, M., Monteon, J., Valdiosera, A., Bermudez, A., Liao-Chan, S., Wong, T., Melnick, J., Theunissen, J.-W., Flory, M. R., Houser, D., Venstrom, K., Levashova, Z., Sauer, P., Migone, T.-S., ... Jackson, D. Y. (2015). Antibody–Drug Conjugates (ADCs) Derived from Interchain Cysteine Cross-Linking Demonstrate Improved Homogeneity and Other Pharmacological Properties over Conventional Heterogeneous ADCs. *Molecular Pharmaceutics*, 12(11), 3986–3998.
- Berg, P., & Mertz, J. E. (2010). Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. *Genetics*, 184(1), 9–17.
- Bergmann, M., & Fraenkel-Conrat, H. (1938). THE ENZYMATIC SYNTHESIS OF PEPTIDE BONDS. *Journal of Biological Chemistry*, 124(1), 1–6.
- Birrer, M. J., Moore, K. N., Betella, I., & Bates, R. C. (2019). Antibody–Drug Conjugate-Based Therapeutics: State of the Science. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 111(6), 538–549.
- Bloom, J. D., Labthavikul, S. T., Otey, C. R., & Arnold, F. H. (2006). Protein stability promotes evolvability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5869–5874.
- Boersma, Y. L., Dröge, M. J., & Quax, W. J. (2007). Selection strategies for improved biocatalysts. *FEBS Journal*, 274(9), 2181–2195.
- Böhme, M. (2021). Optimierung von Trypsilagase zur C-terminalen Modifikation von Proteinen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bordusa, F., Ullmann, D., Elsner, C., & Jakubke, H. (1997). Substrate Mimetic Mediated Peptide Synthesis: An Irreversible Ligation Strategy That Is Independent of Substrate Specificity. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 36(22), 2473–2475.
- Böttcher, D., & Bornscheuer, U. T. (2018). Optimierung von Enzymen. In K.-E. Jaeger, A. Liese, & C. Syldatk (Eds.), *Einführung in die Enzymtechnologie* (pp. 141–150). Springer Berlin Heidelberg.
- Braisted, A. C., Kevin Judice, J., & Wells, J. A. (1997). [14] Synthesis of proteins by subtiligase. In *Methods in Enzymology* (Vol. 289, Issue 1994, pp. 298–313).
- Brucher, B., & Häßler, T. (2019). Enzymatic Process for the Synthesis of Cellobiose. In A. Vogel & O. May (Eds.), *Industrial Enzyme Application* (pp. 167–176). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Coomassie blue staining. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 541). Elsevier Inc.
- Bryant, P., Pabst, M., Badescu, G., Bird, M., McDowell, W., Jamieson, E., Swierkosz, J., Jurlewicz, K., Tommasi, R., Henseleit, K., Sheng, X., Camper, N., Manin, A., Kozakowska, K., Peciak, K., Laurine, E., Grygorash, R., Kyle, A., Morris, D., ... Godwin, A. (2015). In Vitro and In Vivo Evaluation of Cysteine Rebridged Trastuzumab–MMAE Antibody Drug Conjugates with Defined Drug-to-Antibody Ratios. *Molecular Pharmaceutics*, 12(6), 1872–1879.
- Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, U. T. (2012). *Biocatalysts and Enzyme Technology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Buchner, E. (1897). Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 30(1), 1110–1113.
- Bunzel, H. A., Garrabou, X., Pott, M., & Hilvert, D. (2018). Speeding up enzyme

- discovery and engineering with ultrahigh-throughput methods. *Current Opinion in Structural Biology*, 48, 149–156.
- Buß, O., Rudat, J., & Ochsenreither, K. (2018). FoldX as Protein Engineering Tool: Better Than Random Based Approaches? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 25–33.
- Cadwell, R. C., & Joyce, G. F. (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Genome Research*, 2(1), 28–33.
- Catani, M., De Luca, C., Medeiros Garcia Alcântara, J., Manfredini, N., Perrone, D., Marchesi, E., Weldon, R., Müller-Späth, T., Cavazzini, A., Morbidelli, M., & Sponchioni, M. (2020). Oligonucleotides: Current Trends and Innovative Applications in the Synthesis, Characterization, and Purification. *Biotechnology Journal*, 15(8), 1900226.
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 329–332.
- Chari, R. V. J., Miller, M. L., & Widdison, W. C. (2014). Antibody-drug conjugates: An emerging concept in cancer therapy. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(15), 3796–3827.
- Chassy, B. M., Mercenier, A., & Flickinger, J. (1988). Transformation of bacteria by electroporation. *Trends in Biotechnology*, 6(12), 303–309.
- Chen, I., Dorr, B. M., & Liu, D. R. (2011). A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11399–11404.
- Chica, R. A., Doucet, N., & Pelletier, J. N. (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4), 378–384.
- Chovancova, E., Pavelka, A., Benes, P., Strnad, O., Brezovsky, J., Kozlikova, B., Gora, A., Sustr, V., Klvana, M., Medek, P., Biedermannova, L., Sochor, J., & Damborsky, J. (2012). CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Computational Biology*, 8(10), e1002708.
- Chudasama, V., Maruani, A., & Caddick, S. (2016). Recent advances in the construction of antibody-drug conjugates. *Nature Chemistry*, 8(2), 114–119.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16(1), 23–52.
- D'Amico, L., Menzel, U., Prummer, M., Müller, P., Buchi, M., Kashyap, A., Haessler, U., Yermanos, A., Gébleux, R., Briendl, M., Hell, T., Wolter, F. I., Beerli, R. R., Truxova, I., Radek, Š., Vlajnic, T., Grawunder, U., Reddy, S., & Zippelius, A. (2019). A novel anti-HER2 anthracycline-based antibody-drug conjugate induces adaptive anti-tumor immunity and potentiates PD-1 blockade in breast cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 16.
- Delagrange, S., & Murphy, D. J. (2003). In Vitro Evolution of Proteins for Drug Development. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1(supplement 2), 187–198.
- Dennler, P., Chiotellis, A., Fischer, E., Brégeon, D., Belmant, C., Gauthier, L., Lhospice, F., Romagne, F., & Schibli, R. (2014). Transglutaminase-Based Chemo-Enzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 25(3), 569–578.

- Derewenda, Z. S., Derewenda, U., & Kobos, P. M. (1994). (His)Cε-H…O=C< Hydrogen Bond in the Active Sites of Serine Hydrolases. *Journal of Molecular Biology*, 241(1), 83–93.
- Dovgan, I., Koniev, O., Kolodych, S., & Wagner, A. (2019). Antibody-Oligonucleotide Conjugates as Therapeutic, Imaging, and Detection Agents. *Bioconjugate Chemistry*, 30(10), 2483–2501.
- Drachman, J. G., & Senter, P. D. (2013). Antibody-drug conjugates: the chemistry behind empowering antibodies to fight cancer. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2013(August), 306–310.
- Drake, P. M., Carlson, A., McFarland, J. M., Bañas, S., Barfield, R. M., Zmolek, W., Kim, Y. C., Huang, B. C. B., Kudirka, R., & Rabuka, D. (2018). CAT-02-106, a Site-Specifically Conjugated Anti-CD22 Antibody Bearing an MDR1-Resistant Maytansine Payload Yields Excellent Efficacy and Safety in Preclinical Models. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(1), 161–168.
- Dressler, O. J., Casadevall i Solvas, X., & DeMello, A. J. (2017). Chemical and Biological Dynamics Using Droplet-Based Microfluidics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 10(1), 1–24.
- Duerr, C., & Friess, W. (2019). Antibody-drug conjugates- stability and formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 139(December 2018), 168–176.
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., & Liang, J. (2006). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server), W116–W118.
- Eggert, T., Reetz, M., & Jaeger, K.-E. (2004). Directed evolution by random mutagenesis: a critical evaluation. In *Enzyme Functionality: design, engineering and screening* (pp. 375–390). CRC Press.
- Faber, K. (2018). *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer International Publishing.
- Fallah-Araghi, A., Baret, J.-C., Ryckelynck, M., & Griffiths, A. D. (2012). A completely in vitro ultrahigh-throughput droplet-based microfluidic screening system for protein engineering and directed evolution. *Lab on a Chip*, 12(5), 882.
- Ferguson, E. L., Varache, M., Stokniene, J., & Thomas, D. W. (2020). 19 - Polysaccharides for protein and peptide conjugation. In G. Pasut & S. Zalipsky (Eds.), *Polymer-Protein Conjugates* (pp. 421–453). Elsevier.
- Fernandez-Gacio, A., Uguen, M., & Fastrez, J. (2003). Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends in Biotechnology*, 21(9), 408–414.
- Firestone, S. M., Salinas, F., Nixon, A. E., Baker, S. J., & Benkovic, S. J. (2000). Using an AraC-based three-hybrid system to detect biocatalysts in vivo. *Nature Biotechnology*, 18(5), 544–547.
- Forrer, P., Jung, S., & Plückthun, A. (1999). Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(4), 514–520.
- Fromant, M., Blanquet, S., & Plateau, P. (1995). Direct Random Mutagenesis of Gene-Sized DNA Fragments Using Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 224(1), 347–353.

- Garnock-Jones, K. P., Keating, G. M., & Scott, L. J. (2010). Trastuzumab. *Drugs*, 70(2), 215–239.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–608). Humana Press.
- Genz, M., Vickers, C., van den Bergh, T., Joosten, H.-J., Dörr, M., Höhne, M., & Bornscheuer, U. (2015). Alteration of the Donor/Acceptor Spectrum of the (S)-Amine Transaminase from *Vibrio fluvialis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26953–26963.
- Gerth, M. L., Patrick, W. M., & Lutz, S. (2004). A second-generation system for unbiased reading frame selection. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(7), 595–602.
- Ghadessy, F. J., Ramsay, N., Boudsocq, F., Loakes, D., Brown, A., Iwai, S., Vaisman, A., Woodgate, R., & Holliger, P. (2004). Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution. *Nature Biotechnology*, 22(6), 755–759.
- Gissel, S. (2017). *Etablierung des Phage Display-Verfahrens für die Optimierung der Trypsiligase*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., & Singh, R. M. M. (1966). Hydrogen Ion Buffers for Biological Research *. *Biochemistry*, 5(2), 467–477.
- Graf, L., Craik, C. S., Patthy, A., Rocznak, S., Fletterick, R. J., & Rutter, W. J. (1987). Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry*, 26(9), 2616–2623.
- Griffiths, A. D., & Tawfik, D. S. (2003). Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization. *The EMBO Journal*, 22(1), 24–35.
- Griffiths, A. D., & Tawfik, D. S. (2006). Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends in Biotechnology*, 24(9), 395–402.
- Grimsley, G. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2009). A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 18(1), 247–251.
- Guerois, R., Nielsen, J. E., & Serrano, L. (2002). Predicting Changes in the Stability of Proteins and Protein Complexes: A Study of More Than 1000 Mutations. *Journal of Molecular Biology*, 320(2), 369–387.
- Hamblett, K. J., Senter, P. D., Chace, D. F., Sun, M. M. C., Lenox, J., Cerveny, C. G., Kissler, K. M., Bernhardt, S. X., Kopcha, A. K., Zabinski, R. F., Meyer, D. L., & Francisco, J. A. (2004). Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate. *Clinical Cancer Research*, 10(20), 7063–7070.
- Hanes, J., & Plückthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 4937–4942.
- Hardiman, E., Gibbs, M., Reeves, R., & Bergquist, P. (2010). Directed Evolution of a Thermophilic β-glucosidase for Cellulosic Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1–8), 301–312.

- Hayhurst, A., & Georgiou, G. (2001). High-throughput antibody isolation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(6), 683–689.
- Hedstrom, L. (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501–4524.
- Hedstrom, L., Lin, T.-Y., & Fast, W. (1996). Hydrophobic Interactions Control Zymogen Activation in the Trypsin Family of Serine Proteases. *Biochemistry*, 35(14), 4515–4523.
- Hedstrom, L., Perona, J. J., & Rutter, W. J. (1994). Converting Trypsin to Chymotrypsin: Residue 172 Is a Substrate Specificity Determinant. *Biochemistry*, 33(29), 8757–8763.
- Hess, K. L., & Jewell, C. M. (2020). Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioengineering & Translational Medicine*, 5(1), 1–15.
- Hilpert, K., Hansen, G., Wessner, H., Küttner, G., Welfle, K., Seifert, M., & Höhne, W. (2001). Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Engineering, Design and Selection*, 14(10), 803–806.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51–59.
- Hogrefe, H. H., Cline, J., Youngblood, G. L., & Allen, R. M. (2002). Creating Randomized Amino Acid Libraries with the QuikChange[®] Multi Site-Directed Mutagenesis Kit. *BioTechniques*, 33(5), 1158–1165.
- Holstein, J. M., Gylstorff, C., & Hollfelder, F. (2021). Cell-free Directed Evolution of a Protease in Microdroplets at Ultrahigh Throughput. *ACS Synthetic Biology*, 10(2), 252–257.
- Hoogenboom, H. R., de Bruïne, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J.-W., & Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4(1), 1–20.
- Hoyt, E. A., Cal, P. M. S. D., Oliveira, B. L., & Bernardes, G. J. L. (2019). Contemporary approaches to site-selective protein modification. *Nature Reviews Chemistry*, 3(3), 147–171.
- Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J., & Steigemann, W. (1974). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Journal of Molecular Biology*, 89(1), 73–101.
- Huisman, G. W., & Gray, D. (2002). Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 352–358.
- Jeger, S., Zimmermann, K., Blanc, A., Grünberg, J., Honer, M., Hunziker, P., Struthers, H., & Schibli, R. (2010). Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(51), 9995–9997.
- Junutula, J. R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D. D., Weir, S., Chen, Y., Simpson, M., Tsai, S. P., Dennis, M. S., Lu, Y., Meng, Y. G., Ng, C., Yang, J., Lee, C. C., Duenas, E., Gorrell, J., Katta, V., Kim, A., ... Mallet, W. (2008). Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nature Biotechnology*, 26(8), 925–932.

- Kanagawa, T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4), 317–323.
- Kayushin, a L., Korosteleva, M. D., Miroshnikov, a I., Kosch, W., Zubov, D., & Piel, N. (1996). A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Research*, 24(19), 3748–3755.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/article/fcgi?artid=146157&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kehoe, J. W., & Kay, B. K. (2005). Filamentous Phage Display in the New Millennium. *Chemical Reviews*, 105(11), 4056–4072.
- Kelly, R. M., Leemhuis, H., Gätjen, L., & Dijkhuizen, L. (2008). Evolution toward Small Molecule Inhibitor Resistance Affects Native Enzyme Function and Stability, Generating Acarbose-insensitive Cyclodextrin Glucanotransferase Variants. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10727–10734.
- Keohavong, P., & Thilly, W. G. (1989). Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9253–9257.
- Kille, S., Acevedo-Rocha, C. G., Parra, L. P., Zhang, Z.-G., Opperman, D. J., Reetz, M. T., & Acevedo, J. P. (2013). Reducing Codon Redundancy and Screening Effort of Combinatorial Protein Libraries Created by Saturation Mutagenesis. *ACS Synthetic Biology*, 2(2), 83–92.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345–351.
- Kontermann, R., & Dübel, S. (2010). Antibody Engineering. In R. Kontermann & S. Dübel (Eds.), *Second Edition*. Springer Berlin Heidelberg.
- Krall, N., da Cruz, F. P., Boutureira, O., & Bernardes, G. J. L. (2016). Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. *Nature Chemistry*, 8(2), 103–113.
- Krem, M. M. (2001). Molecular markers of serine protease evolution. *The EMBO Journal*, 20(12), 3036–3045.
- Kühne, W. (1876). Ueber das Verhalten Verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente. *FEBS Letters*, 62(S1), E4–E7.
- Kuipers, R. K., Joosten, H.-J., van Berkel, W. J. H., Leferink, N. G. H., Rooijen, E., Ittmann, E., van Zimmeren, F., Jochens, H., Bornscheuer, U., Vriend, G., Martins dos Santos, V. A. P., & Schaap, P. J. (2010). 3DM: Systematic analysis of heterogeneous superfamily data to discover protein functionalities. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(9), NA-NA.
- Kumar, R., Parray, H. A., Shrivastava, T., Sinha, S., & Luthra, K. (2019). Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 907–918.
- Labrou, N. E. (2009). Random Mutagenesis Methods for In Vitro Directed Enzyme Evolution. *Current Protein and Peptide Science*, 999(999), 1–12.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lahr, D. J. G., & Katz, L. A. (2009). Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase. *BioTechniques*, 47(4), 857–

- 866.
- Lambert, J. M., & Chari, R. V. J. (2014). Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1): An antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(16), 6949–6964.
- Ledsgaard, L., Kilstrop, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., & Laustsen, A. (2018). Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins*, 10(6), 236.
- Leemhuis, H., Kelly, R. M., & Dijkhuizen, L. (2009). Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB Life*, 61(3), 222–228.
- Leemhuis, H., Nightingale, K. P., & Hollfelder, F. (2008). Directed evolution of a histone acetyltransferase - enhancing thermostability, whilst maintaining catalytic activity and substrate specificity. *FEBS Journal*, 275(22), 5635–5647.
- Legendre, D., Laraki, N., Gräslund, T., Bjørnvad, M. E., Bouchet, M., Nygren, P.-Å., Borchert, T. V., & Fastrez, J. (2000). Display of active subtilisin 309 on phage: analysis of parameters influencing the selection of subtilisin variants with changed substrate specificity from libraries using phosphorylating inhibitors 1 Edited by A. R. Fersht. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 87–102.
- Leung, D. W. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, 1, 11–15.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(2), 105–124.
- Liebscher, S. (2008). *N- und C-terminale Modifizierung von Polypeptiden und Proteinen*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Liebscher, S., Kornberger, P., Fink, G., Trost-Gross, E.-M., Höss, E., Skerra, A., & Bordusa, F. (2014). Derivatization of Antibody Fab Fragments: A Designer Enzyme for Native Protein Modification. *ChemBioChem*, 15(8), 1096–1100.
- Liebscher, S., Mathea, S., Aumüller, T., Pech, A., & Bordusa, F. (2021). Trypsilicase-Catalyzed Labeling of Proteins on Living Cells. *ChemBioChem*, 22(7), 1201–1204.
- Liebscher, S., Schöpfel, M., Aumüller, T., Sharkhuukhen, A., Pech, A., Höss, E., Parthier, C., Jahreis, G., Stubbs, M. T., & Bordusa, F. (2014). N-Terminal Protein Modification by Substrate-Activated Reverse Proteolysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(11), 3024–3028.
- Lim, S. W., & Abate, A. R. (2013). Ultrahigh-throughput sorting of microfluidic drops with flow cytometry. *Lab on a Chip*, 13(23), 4563.
- Lin-Cereghino, J., Wong, W., & Giang, W. (2005). Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques*, 38(1), 44–48.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2504082/>
- Lin-Goerke, J. L., Robbins, D. J., & Burczak, J. D. (1997). PCR-Based Random Mutagenesis Using Manganese and Reduced dNTP Concentration. *BioTechniques*, 23(3), 409–412.
- Lin, H., & Cornish, V. W. (2002). Screening and Selection Methods for Large-Scale Analysis of Protein Function. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(23), 4402–4425.
- Lin, H., Tao, H., & Cornish, V. W. (2004). Directed Evolution of a Glycosynthase via Chemical Complementation. *Journal of the American Chemical Society*,

- 126(46), 15051–15059.
- Ling, L. L., Keohavong, P., Dias, C., & Thilly, W. G. (1991). Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: Modified T₇, Taq, and vent DNA polymerases. *Genome Research*, 1(1), 63–69.
- Liu, C. C., & Schultz, P. G. (2010). Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 413–444.
- Liu, L., Wang, J., Rosenberg, D., Zhao, H., Lengyel, G., & Nadel, D. (2018). Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 21(May), 783–793.
- Longwell, C. K., Labanieh, L., & Cochran, J. R. (2017). High-throughput screening technologies for enzyme engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 48, 196–202.
- Lõoke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50(5), 325–328.
- Lülsdorf, N., Vojcic, L., Hellmuth, H., Weber, T. T., Mußmann, N., Martinez, R., & Schwaneberg, U. (2015). A first continuous 4-aminoantipyrine (4-AAP)-based screening system for directed esterase evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 5237–5246.
- Lutz, S. (2010). Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(6), 734–743.
- MacBeath, G., Kast, P., & Hilvert, D. (1998). Redesigning Enzyme Topology by Directed Evolution. *Science*, 279(5358), 1958–1961.
- Mair, P., Gielen, F., & Hollfelder, F. (2017). Exploring sequence space in search of functional enzymes using microfluidic droplets. *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 137–144.
- Markel, U., Essani, K. D., Besirlioglu, V., Schiffels, J., Streit, W. R., & Schwaneberg, U. (2020). Advances in ultrahigh-throughput screening for directed enzyme evolution. *Chemical Society Reviews*, 49(1), 233–262.
- Marques, S. M., Planas-Iglesias, J., & Damborsky, J. (2021). Web-based tools for computational enzyme design. *Current Opinion in Structural Biology*, 69, 19–34.
- Martínez, R., & Schwaneberg, U. (2013). A roadmap to directed enzyme evolution and screening systems for biotechnological applications. *Biological Research*, 46(4), 395–405.
- Maruani, A., Smith, M. E. B., Miranda, E., Chester, K. A., Chudasama, V., & Caddick, S. (2015). A plug-and-play approach to antibody-based therapeutics via a chemoselective dual click strategy. *Nature Communications*, 6(1), 6645.
- Mastrobattista, E., Taly, V., Chanudet, E., Treacy, P., Kelly, B. T., & Griffiths, A. D. (2005). High-Throughput Screening of Enzyme Libraries: In Vitro Evolution of a β-Galactosidase by Fluorescence-Activated Sorting of Double Emulsions. *Chemistry & Biology*, 12(12), 1291–1300.
- Matsuda, Y., Malinao, M. C., Robles, V., Song, J., Yamada, K., & Mendelsohn, B. A. (2020). Proof of site-specificity of antibody-drug conjugates produced by chemical conjugation technology: AJICAP first generation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1140(November 2019).
- Maurizi, M. R. (1992). Proteases and protein degradation in Escherichia coli.

- Experientia*, 48(2), 178–201.
- Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A., Griffiths, A. D., & Heyman, J. A. (2013). Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*, 8(5), 870–891.
- McCullum, E. O., Williams, B. A. R., Zhang, J., & Chaput, J. C. (2010). Random Mutagenesis by Error-Prone PCR. In J. Braman (Ed.), *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition* (pp. 103–109). Humana Press.
- McGrath, M. E., Vasquez, J. R., Craik, C. S., Yang, A. S., Honig, B., & Fletterick, R. J. (1992). Perturbing the polar environment of Asp102 in trypsin: consequences of replacing conserved Ser214. *Biochemistry*, 31(12), 3059–3064.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149–2154.
- Meyer, C., Liebscher, S., & Bordusa, F. (2016). Selective Coupling of Click Anchors to Proteins via Trypsiligase. *Bioconjugate Chemistry*, 27(1), 47–53.
- Meyerhans, A., Vartanian, J.-P., & Wain-Hobson, S. (1990). DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Research*, 18(7), 1687–1691.
- Mikhailova, A. G., Likhareva, V. V., Vaskovsky, B. V., Garanin, S. K., Onoprienko, L. V., Prudchenko, I. A., Chikin, L. D., & Rumsh, L. D. (2004). Study of Secondary Specificity of Enteropeptidase in Comparison with Trypsin. *Biochemistry (Moscow)*, 69(8), 909–917.
- Milczek, E. M. (2018). Commercial Applications for Enzyme-Mediated Protein Conjugation: New Developments in Enzymatic Processes to Deliver Functionalized Proteins on the Commercial Scale. *Chemical Reviews*, 118(1), 119–141.
- Mimmi, S., Maisano, D., Quinto, I., & Iaccino, E. (2019). Phage Display: An Overview in Context to Drug Discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(2), 87–91.
- Miyazaki, K., & Takenouchi, M. (2002). Creating Random Mutagenesis Libraries Using Megaprimer PCR of Whole Plasmid. *BioTechniques*, 33(5), 1033–1038.
- Morley, K. L., & Kazlauskas, R. J. (2005). Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology*, 23(5), 231–237.
- Nagano, K., & Tsutsumi, Y. (2021). Phage Display Technology as a Powerful Platform for Antibody Drug Discovery. *Viruses*, 13(2), 178.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M., & Upton, S. J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 28(3), 239–242.
- Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides (Recommendations 1983). (1984). *Pure and Applied Chemistry*, 56(5), 595–624.
- Odelberg, S. J., Weiss, R. B., Hata, A., & White, R. (1995). Template-switching during DNA synthesis by *Thermus aquaticus* DNA polymerase I. *Nucleic Acids Research*, 23(11), 2049–2057.
- Olsen, M., Iverson, B., & Georgiou, G. (2000). High-throughput screening of enzyme libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(4), 331–337.
- Ono, A., Matsuda, A., Zhao, J., & Santi, D. V. (1995). The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 23(22), 4677–4682.
- Palmer, A. G. (2015). Enzyme Dynamics from NMR Spectroscopy. *Accounts of*

- Chemical Research*, 48(2), 457–465.
- Pande, J., Szewczyk, M. M., & Grover, A. K. (2010). Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, 28(6), 849–858.
- Pantazes, R. J., Grisewood, M. J., Li, T., Gifford, N. P., & Maranas, C. D. (2015). The Iterative Protein Redesign and Optimization (IPRO) suite of programs. *Journal of Computational Chemistry*, 36(4), 251–263.
- Parra, L. P., Agudo, R., & Reetz, M. T. (2013). Directed Evolution by Using Iterative Saturation Mutagenesis Based on Multiresidue Sites. *ChemBioChem*, 14(17), 2301–2309.
- Parthasarathy, S., & Murthy, M. R. N. (2000). Protein thermal stability: insights from atomic displacement parameters (B values). *Protein Engineering, Design and Selection*, 13(1), 9–13.
- Parthiban, V., Gromiha, M. M., & Schomburg, D. (2006). CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server), W239–W242.
- Paschke, M. (2006). Phage display systems and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 2–11.
- Patrick, W. M., & Firth, A. E. (2005). Strategies and computational tools for improving randomized protein libraries. *Biomolecular Engineering*, 22(4), 105–112.
- Patrick, W. M., Firth, A. E., & Blackburn, J. M. (2003). User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein Engineering Design and Selection*, 16(6), 451–457.
- Pavelka, A., Chovancova, E., & Damborsky, J. (2009). HotSpot Wizard: a web server for identification of hot spots in protein engineering. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server), W376–W383.
- Pearson, A. R., & Owen, R. L. (2009). Combining X-ray crystallography and single-crystal spectroscopy to probe enzyme mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, 37(2), 378–381.
- Pedersen, H., Hölder, S., Sutherlin, D. P., Schwitter, U., King, D. S., & Schultz, P. G. (1998). A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10523–10528.
- Peralta-Yahya, P., Carter, B. T., Lin, H., Tao, H., & Cornish, V. W. (2008). High-Throughput Selection for Cellulase Catalysts Using Chemical Complementation. *Journal of the American Chemical Society*, 130(51), 17446–17452.
- Perona, J. J., Hedstrom, L., Rutter, W. J., & Fletterick, R. J. (1995). Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry*, 34(5), 1489–1499.
- Piotukh, K., Geltinger, B., Heinrich, N., Gerth, F., Beyermann, M., Freund, C., & Schwarzer, D. (2011). Directed Evolution of Sortase A Mutants with Altered Substrate Selectivity Profiles. *Journal of the American Chemical Society*, 133(44), 17536–17539.
- Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19–20), 2161–2172.
- Popp, M. W., Antos, J. M., Grotzbreg, G. M., Spooner, E., & Ploegh, H. L. (2007).

- Sortagging: a versatile method for protein labeling. *Nature Chemical Biology*, 3(11), 707–708.
- Potapov, V., & Ong, J. L. (2017). Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. *PLOS ONE*, 12(1), e0169774.
- Rabuka, D., Rush, J. S., DeHart, G. W., Wu, P., & Bertozzi, C. R. (2012). Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags. *Nature Protocols*, 7(6), 1052–1067.
- Radisky, E. S., Lee, J. M., Lu, C.-J. K., & Koshland, D. E. (2006). Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(18), 6835–6840.
- Radzicka, A., & Wolfenden, R. (1988). Comparing the polarities of the amino acids: side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous solution. *Biochemistry*, 27(5), 1664–1670.
- Rall, K. (2004). *Untersuchungen zur Optimierung der Serinprotease Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthese*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rasor, J. P., & Voss, E. (2001). Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General*, 221(1–2), 145–158.
- Read, J. D., Colussi, P. A., Ganatra, M. B., & Taron, C. H. (2007). Acetamide Selection of Kluyveromyces lactis Cells Transformed with an Integrative Vector Leads to High-Frequency Formation of Multicopy Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5088–5096.
- Reetz, M. T. (2011). Laboratory Evolution of Stereoselective Enzymes: A Prolific Source of Catalysts for Asymmetric Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(1), 138–174.
- Reetz, M. T., & Carballeira, J. D. (2007). Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature Protocols*, 2(4), 891–903.
- Reetz, M. T., Carballeira, J. D., & Vogel, A. (2006). Iterative Saturation Mutagenesis on the Basis of B Factors as a Strategy for Increasing Protein Thermostability. *Angewandte Chemie*, 118(46), 7909–7915.
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D., & Lohmer, R. (2008). Addressing the Numbers Problem in Directed Evolution. *ChemBioChem*, 9(11), 1797–1804.
- Reetz, M. T., Prasad, S., Carballeira, J. D., Gumulya, Y., & Bocola, M. (2010). Iterative Saturation Mutagenesis Accelerates Laboratory Evolution of Enzyme Stereoselectivity: Rigorous Comparison with Traditional Methods. *Journal of the American Chemical Society*, 132(26), 9144–9152.
- Reetz, M. T., Wang, L.-W., & Bocola, M. (2006). Directed Evolution of Enantioselective Enzymes: Iterative Cycles of CASTing for Probing Protein-Sequence Space. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(8), 1236–1241.
- Roberts, R. W., & Szostak, J. W. (1997). RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12297–12302.
- Robinson, E., Nunes, J. P. M., Vassileva, V., Maruani, A., Nogueira, J. C. F., Smith, M. E. B., Pedley, R. B., Caddick, S., Baker, J. R., & Chudasama, V. (2017). Pyridazinediones deliver potent, stable, targeted and efficacious antibody-

- drug conjugates (ADCs) with a controlled loading of 4 drugs per antibody. *RSC Advances*, 7(15), 9073–9077.
- Röhm, O. (1908). *Preparation of hides for the manufacture of leather. US886411A*, United States Patent Office.
- Rosenthal, K., & Lütz, S. (2018). Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 11, 58–64.
- Sadler, J. C., Currin, A., & Kell, D. B. (2018). Ultra-high throughput functional enrichment of large monoamine oxidase (MAO-N) libraries by fluorescence activated cell sorting. *The Analyst*, 143(19), 4747–4755.
- Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., & Evershed, R. P. (2013). Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. *Nature*, 493(7433), 522–525.
- Santoro, S. W., & Schultz, P. G. (2002). Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4185–4190.
- Sarkar, G., & Sommer, S. S. (1990). The “megaprimer” method of site-directed mutagenesis. *BioTechniques*, 8(4), 404–407.
<http://europepmc.org/abstract/MED/2340178>
- Saw, P. E., & Song, E.-W. (2019). Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein & Cell*, 10(11), 787–807.
- Schellenberger, V., Jakubke, H.-D., Zapevalova, N. P., & Mitin, Y. V. (1991). Protease-catalyzed peptide synthesis using inverse substrates: The influence of reaction conditions on the trypsin acyl transfer efficiency. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(1), 104–108.
- Schmidt, C. (2018). *Studien zur Optimierung einer ausgewählten Trypsiligasevariante zur Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schmohl, L., Bierlmeier, J., Gerth, F., Freund, C., & Schwarzer, D. (2017). Engineering sortase A by screening a second-generation library using phage display. *Journal of Peptide Science*, 23(7–8), 631–635.
- Schulze, A. (2015). *Optimierung der Trypsiligase zur Modifizierung von Proteinen*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schumacher, F. F., Nunes, J. P. M., Maruani, A., Chudasama, V., Smith, M. E. B., Chester, K. A., Baker, J. R., & Caddick, S. (2014). Next generation maleimides enable the controlled assembly of antibody-drug conjugates via native disulfide bond bridging. *Org. Biomol. Chem.*, 12(37), 7261–7269.
- SDS-PAGE Gel. (2015). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(7).
- Seelig, B., & Szostak, J. W. (2007). Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold. *Nature*, 448(7155), 828–831.
- Shahsavarian, M. A., Chaaya, N., Costa, N., Boquet, D., Atkinson, A., Offmann, B., Kaveri, S. V., Lacroix-Desmazes, S., Friboulet, A., Avalle, B., & Padiolleau-Lefèvre, S. (2017). Multitarget selection of catalytic antibodies with β -lactamase activity using phage display. *The FEBS Journal*, 284(4), 634–653.
- Sheludko, Y. V., & Fessner, W.-D. (2020). Winning the numbers game in enzyme evolution – fast screening methods for improved biotechnology proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 63, 123–133.
- Siloto, R. M. P., & Weselake, R. J. (2012). Site saturation mutagenesis: Methods

- and applications in protein engineering. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(3), 181–189.
- Simon, J. (2018). *Studien zur Optimierung einer ausgewählten Trypsiligasevariante zur Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, 228(4705), 1315–1317.
- Smith, G. P., & Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chemical Reviews*, 97(2), 391–410.
- Smith, M. R., Khera, E., & Wen, F. (2015). Engineering Novel and Improved Biocatalysts by Cell Surface Display. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(16), 4021–4032.
- Soumillion, P., & Fastrez, J. (2003). Investigation of Phage Display for the Directed Evolution of Enzymes. In *Directed Molecular Evolution of Proteins* (Vol. 1, pp. 79–110). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Soumillion, P., Jespers, L., Bouchet, M., Marchand-Brynaert, J., Sartiaux, P., & Fastrez, J. (1994). Phage display of enzymes and in vitro selection for catalytic activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 47(2–3), 175–190.
- Spicer, C. D., Jumeaux, C., Gupta, B., & Stevens, M. M. (2018). Peptide and protein nanoparticle conjugates: Versatile platforms for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 47(10), 3574–3620.
- St. Amant, A. H., Huang, F., Lin, J., Lemen, D., Chakiath, C., Mao, S., Fazenbaker, C., Zhong, H., Harper, J., Xu, W., Patel, N., Adams, L., Vijayakrishnan, B., Howard, P. W., Marelli, M., Wu, H., Gao, C., Read de Alaniz, J., & Christie, R. J. (2019). A Reactive Antibody Platform for One-Step Production of Antibody–Drug Conjugates through a Diels–Alder Reaction with Maleimide. *Bioconjugate Chemistry*, 30(9), 2340–2348.
- Stefan, N., Gébleux, R., Waldmeier, L., Hell, T., Escher, M., Wolter, F. I., Grawunder, U., & Beerli, R. R. (2017). Highly potent, anthracycline-based antibody-drug conjugates generated by enzymatic, site-specific conjugation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(5), 879–892.
- Strop, P., Delaria, K., Foletti, D., Witt, J. M., Hasa-Moreno, A., Poulsen, K., Casas, M. G., Dorywalska, M., Farias, S., Pios, A., Lui, V., Dushin, R., Zhou, D., Navaratnam, T., Tran, T.-T., Sutton, J., Lindquist, K. C., Han, B., Liu, S.-H., ... Rajpal, A. (2015). Site-specific conjugation improves therapeutic index of antibody drug conjugates with high drug loading. *Nature Biotechnology*, 33(7), 694–696.
- Strop, P., Liu, S.-H., Dorywalska, M., Delaria, K., Dushin, R. G., Tran, T.-T., Ho, W.-H., Farias, S., Casas, M. G., Abdiche, Y., Zhou, D., Chandrasekaran, R., Samain, C., Loo, C., Rossi, A., Rickert, M., Krimm, S., Wong, T., Chin, S. M., ... Rajpal, A. (2013). Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates. *Chemistry & Biology*, 20(2), 161–167.
- Sumbalova, L., Stourac, J., Martinek, T., Bednar, D., & Damborsky, J. (2018). HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W356–W362.
- Sun, Z., Liu, Q., Qu, G., Feng, Y., & Reetz, M. T. (2019). Utility of B-Factors in

- Protein Science: Interpreting Rigidity, Flexibility, and Internal Motion and Engineering Thermostability. *Chemical Reviews*, 119(3), 1626–1665.
- Tachioka, M., Sugimoto, N., Nakamura, A., Sunagawa, N., Ishida, T., Uchiyama, T., Igarashi, K., & Samejima, M. (2016). Development of simple random mutagenesis protocol for the protein expression system in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 199.
- Takahashi, N., Kakinuma, H., Liu, L., Nishi, Y., & Fujii, I. (2001). In vitro abzyme evolution to optimize antibody recognition for catalysis. *Nature Biotechnology*, 19(6), 563–567.
- Tamura, K., Tsurutani, J., Takahashi, S., Iwata, H., Krop, I. E., Redfern, C., Sagara, Y., Doi, T., Park, H., Murthy, R. K., Redman, R. A., Jikoh, T., Lee, C., Sugihara, M., Shahidi, J., Yver, A., & Modi, S. (2019). Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in patients with advanced HER2-positive breast cancer previously treated with trastuzumab emtansine: a dose-expansion, phase 1 study. *The Lancet Oncology*, 20(6), 816–826.
- Tanaka, T., Yamada, R., Ogino, C., & Kondo, A. (2012). Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 577–591.
- Tao, J., Lin, G. Q., & Liese, A. (2009). Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry. In J. (Alex) Tao, G.-Q. Lin, & A. Liese (Eds.), *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry: Discovery, Development, and Manufacturing*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Tawfik, D. S., & Griffiths, A. D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology*, 16(7), 652–656.
- Taylor, S. V., Kast, P., & Hilvert, D. (2001). Investigating and Engineering Enzymes by Genetic Selection. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(18), 3310–3335.
- Thomas, S. M., DiCosimo, R., & Nagarajan, V. (2002). Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends in Biotechnology*, 20(6), 238–242.
- Thurlkill, R. L., Grimsley, G. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2006). pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Science*, 15(5), 1214–1218.
- van Berkel, S. S., & van Delft, F. L. (2018). Enzymatic strategies for (near) clinical development of antibody-drug conjugates. *Drug Discovery Today: Technologies*, 30, 3–10.
- van Bloois, E., Winter, R. T., Kolmar, H., & Fraaije, M. W. (2011). Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 29(2), 79–86.
- van Geel, R., Wijdeven, M. A., Heesbeen, R., Verkade, J. M. M., Wasiel, A. A., van Berkel, S. S., & van Delft, F. L. (2015). Chemoenzymatic Conjugation of Toxic Payloads to the Globally Conserved N-Glycan of Native mAbs Provides Homogeneous and Highly Efficacious Antibody–Drug Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 26(11), 2233–2242.
- van Rossum, T., Kengen, S. W. M., & van der Oost, J. (2013). Reporter-based screening and selection of enzymes. *FEBS Journal*, 280(13), 2979–2996.
- Vanella, R., Kovacevic, G., Doffini, V., Fernández de Santaella, J., & Nash, M. A. (2022). High-throughput screening, next generation sequencing and machine learning: advanced methods in enzyme engineering. *Chemical*

- Communications (Cambridge, England), 58(15), 2455–2467.*
- Vanwetswinkel, S., Marchand-Brynaert, J., & Fastrez, J. (1996). Selection of the most active enzymes from a mixture of phage-displayed β -lactamase mutants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 6(7), 789–792.*
- Verkade, J., Wijdeven, M., & Janssen, B. (2018). A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Stability, and Therapeutic Index of Antibody–Drug Conjugates. *Antibodies, 7(1), 12.*
- Victorino da Silva Amatto, I., Gonsales da Rosa-Garzon, N., Antônio de Oliveira Simões, F., Santiago, F., Pereira da Silva Leite, N., Raspante Martins, J., & Cabral, H. (2021). Enzyme engineering and its industrial applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry, 2, bab.2117.*
- Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, C. K., Wellnhofer, G., & Moroney, S. E. (1994). Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Research, 22(25), 5600–5607.*
- Vogel, A., & May, O. (2019). *Industrial Enzyme Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Voigt, J., Meyer, C., & Bordusa, F. (2022). Synthesis of Multiple Bispecific Antibody Formats with Only One Single Enzyme Based on Enhanced Trypsiligase. *International Journal of Molecular Sciences, 23(6), 3144.*
- Wahler, D., & Reymond, J.-L. (2001). High-throughput screening for biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology, 12(6), 535–544.*
- Walsh, S. J., Bargh, J. D., Dannheim, F. M., Hanby, A. R., Seki, H., Counsell, A. J., Ou, X., Fowler, E., Ashman, N., Takada, Y., Isidro-Llobet, A., Parker, J. S., Carroll, J. S., & Spring, D. R. (2021). Site-selective modification strategies in antibody–drug conjugates. *Chemical Society Reviews, 50(2), 1305–1353.*
- Wang, J. D., Herman, C., Tipton, K. A., Gross, C. A., & Weissman, J. S. (2002). Directed Evolution of Substrate-Optimized GroEL/S Chaperonins. *Cell, 111(7), 1027–1039.*
- Wang, Y., & Wu, C. (2018). Site-Specific Conjugation of Polymers to Proteins. *Biomacromolecules, 19(6), 1804–1825.*
- Widersten, M., & Mannervik, B. (1995). Glutathione Transferases with Novel Active Sites Isolated by Phage Display from a Library of Random Mutants. *Journal of Molecular Biology, 250(2), 115–122.*
- Willett, W. S., Brinen, L. S., Fletterick, R. J., & Craik, C. S. (1996). Delocalizing Trypsin Specificity with Metal Activation. *Biochemistry, 35(19), 5992–5998.*
- Willett, W. S., Gillmor, S. A., Perona, J. J., Fletterick, R. J., & Craik, C. S. (1995). Engineered Metal Regulation of Trypsin Specificity. *Biochemistry, 34(7), 2172–2180.*
- Wolfenden, R., & Snider, M. J. (2001). The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts of Chemical Research, 34(12), 938–945.*
- Woodley, J. M. (2008). New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology, 26(6), 321–327.*
- Woycechowsky, K. J., & Hilvert, D. (2004). Deciphering enzymes. Genetic selection as a probe of structure and mechanism. *European Journal of Biochemistry, 271(9), 1630–1637.*
- Yamada, K., Shikida, N., Shimbo, K., Ito, Y., Khedri, Z., Matsuda, Y., & Mendelsohn, B. A. (2019). AJICAP: Affinity Peptide Mediated Regiodivergent

- Functionalization of Native Antibodies. *Angewandte Chemie*, 131(17), 5648–5653.
- You, L., & Arnold, F. H. (1996). Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. “*Protein Engineering, Design and Selection*,” 9(1), 77–83.
- Young, T. S., & Schultz, P. G. (2010). Beyond the Canonical 20 Amino Acids: Expanding the Genetic Lexicon. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11039–11044.
- Yousef, G. M., Elliott, M. B., Kopolovic, A. D., Serry, E., & Diamandis, E. P. (2004). Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1698(1), 77–86.
- Zerner, B., & Bender, M. L. (1964). The Kinetic Consequences of the Acyl-Enzyme Mechanism for the Reactions of Specific Substrates with Chymotrypsin. *Journal of the American Chemical Society*, 86(18), 3669–3674.
- Zinchenko, A., Devenish, S. R. A., Kintses, B., Colin, P.-Y., Fischlechner, M., & Hollfelder, F. (2014). One in a Million: Flow Cytometric Sorting of Single Cell-Lysate Assays in Monodisperse Picolitre Double Emulsion Droplets for Directed Evolution. *Analytical Chemistry*, 86(5), 2526–2533.
- Zong, Y., Bice, T. W., Ton-That, H., Schneewind, O., & Narayana, S. V. L. (2004). Crystal Structures of *Staphylococcus aureus* Sortase A and Its Substrate Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31383–31389.

Danksagung

Prof. Dr. Frank Bordusa möchte ich für die Vergabe des spannenden Promotionsthemas, für die zahlreichen und konstruktiven Diskussionen sowie für die bereitgestellten, exzellenten Arbeitsbedingungen danken.

Dr. Sandra Liebscher danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft, den hohen organisatorischen Aufwand zum Erhalt der exzellenten Arbeitsbedingungen in den Laboren der Arbeitsgruppe und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Sven Pfeifer danke ich für die Hilfestellungen und zahlreichen Hinweise zum Bibliotheksdesign sowie für die Möglichkeit die Infrastruktur der NWG „Künstl. Bindepoteine“ im Rahmen der Bibliothekskonstruktion und Screening verwenden zu können.

Dr. Dominik Schneider möchte ich für seine apparative Unterstützung im Zuge des Screenings danken.

Dr. Marcus Böhme danke ich für die vielen Jahre der erfolgreichen Zusammenarbeit und die unzähligen Diskussionen zu experimentellen Problemstellungen.

Steffanie Kaufmann, Dr. Bianka Hartrodt und Dr. Christoph Meyer danke ich für die Synthese und Reinigung der in dieser Arbeit verwendeten Peptide.

Christa Langer und Mareike Leidig möchte ich für ihre generellen Hilfestellungen und ihren unermüdlichen Einsatz zum Erhalt der Ordnung im Labor danken.

Franziska Becker, Hilke Buß, Jann Simon Groen und Simon Müller danke ich für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit in Form von erfolgreichen Bachelorarbeiten sowie **Julia Simon** für ihren wichtigen Beitrag zur Relevanz der einzelnen Mutationen anhand einer ausgezeichneten Masterarbeit.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der **Arbeitsgruppe** danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Insbesondere **Falko Jähnert, Dr. Andreas Simon und Dennis Treblow** danke ich für ihren Einsatz zur apparativen Unterstützung und der Wartung bzw. Reparatur diverser Geräte.

Meinen Kommilitonen **Dr. Christian Arlt, Dr. Marcus Böhme, Dr. Benjamin Genz** und **Dr. Beate Hoffmann** danke ich für die jahrelange Freundschaft und den regelmäßigen Erfahrungsaustausch. Ich hoffe, dass unsere jährlichen Wochenendausflüge noch lange bestehen bleiben.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern **Gabriele** und **Holger Wartner** danke ich für ihre immerwährende und bedingungslose Unterstützung. Ihr habt diesen Meilenstein meines Lebens erst ermöglicht.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau **Dr. Susanne Przybylski-Wartner**. Dein allzeit geleisteter Beistand und die gelegentlichen Auszeiten vom Arbeitsalltag mit dir haben ebenfalls wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Familienname	Wartner
Vorname	René
Vorhandener akademischer Grad	Diplom-Biochemiker
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung und beruflicher Werdegang

- 01/2019 – heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Naturstoffbiochemie, Gründungsprojekt „TrypCo“
- 01/2015 – 02/2020 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, BioPharma Translations-institut Dessau Forschungs GmbH (Dessau-Roßlau)
- 06/2012 – 12/2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Naturstoffbiochemie, Doktorand
- 10/2006 – 10/2011 Studium Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Diplom Biochemiker, Diplomarbeit: „Selektion M7-basierender künstlicher Bindepoteine mittels *Phage-Display*“, Betreuer: Dr. Sven Pfeifer, Institut für Biochemie und Biotechnologie, NWG „Künstliche Bindepoteine“
- 08/1997 – 05/2006 Abitur, Integrierte Gesamtschule „Regine Hildebrandt“ (Magdeburg), Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Halle (Saale), den 20.09.2023

Ort, Datum

René Wartner

Publikationsliste

Patent:

Wartner, R., Boehme, M., Bordusa, F., Simon, A.H., Richter, T., Trypsin variants with improved enzymatic properties. Anmeldung: 19.12.2019; Veröffentlichung: 25.06.2020; Patent WO/2020/127808

Tagungsbeiträge - Poster:

Wartner, R., Böhme, M., Simon, A.H., Meyer, C., Dittrich, F., Liebscher, S., Bordusa, F. (2019). TrypCo® Technology – A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs. 11th Annual PEGS Europe, 19.-22.11.2019, Lissabon, Portugal

Wartner, R., Böhme, M., Simon, A.H., Meyer, C., Dittrich, F., Liebscher, S., Bordusa, F. (2019). TrypCo® Technology – A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs. 15th Annual PEGS Boston, 08.-12.04.2019, Boston, MA, USA - Posterpreis

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Halle (Saale), den 20.09.2023

Ort, Datum

René Wartner