

Untersuchungen zur Intein-vermittelten Semisynthese modifizierter Proteine

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt an der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Angela Pöhlmann

geb. am 11.05.1977 in Gera (Thüringen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. F. Bordusa
2. Prof. Dr. N. Sewald

Tag der Verteidigung: 30.11.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000011195

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011195>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielstellung	4
2	Theoretischer Teil	7
2.1	Synthese modifizierter Proteine	7
2.2	Protease-katalysierte Peptidsynthese	18
2.3	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	26
2.3.1	Parvulin 10 - Prototyp der PPIase-Familie der Parvuline	30
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	Auswahl geeigneter Ligationsstellen	33
3.2	Synthese rekombinanter Parvulinfragment-Thioester mittels IMPACT TM - CN-System	35
3.2.1	Synthese der Par63-Thioester	39
3.2.2	Synthese der Par43-Thioester	44
3.3	Initiale Modellreaktionen	48
3.3.1	V8-Protease-katalysierte Ligationsreaktionen	48
3.3.2	Trypsin D189K/K60E-katalysierte Ligationsreaktionen	51
3.3.3	Untersuchungen zur Stabilität der Parvulinfragment-Thioester	56
3.4	Synthese von Parvulin unter kinetischer Kontrolle der Kondensationsreaktionen	63
3.4.1	Studien zur spontanen Parvulinsynthese	70
3.5	Synthese von Parvulin unter temporärem Schutz der Cystein-Thiol-Funktion	75
4	Zusammenfassung	89
5	Experimenteller Teil	93
5.1	Materialien	93
5.2	Untersuchungen zur Expression und Löslichkeit der Intein-Fusionsproteine	98
5.3	Bestimmung der Spalteffizienz von Thiolen	98
5.4	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	99

INHALTSVERZEICHNIS

5.5	Transformation von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	99
5.6	Reinigung von DNA	100
5.7	Enzymatische Modifikation von DNA	100
5.8	Polymerasekettenreaktion	100
5.9	Agarose-Gelelektrophorese	101
5.10	Synthese und Reinigung von Proteinen bzw. Proteinfragmenten	102
5.10.1	Intein-vermittelte Synthese und Reinigung rekombinanter Parvulinfragment-Thioester	102
5.10.2	Chemische Synthese und Reinigung C-terminaler Peptide	104
5.10.3	Rekombinante Synthese und Reinigung von Trypsin D189K/K60E	106
5.11	Einfluß von Harnstoff auf Protease-katalysierte Hydrolysereaktionen	106
5.12	Ligationsreaktionen	107
5.12.1	Enzymatische Ligationsreaktionen	107
5.12.2	<i>Native Chemical Ligation</i>	108
5.13	Untersuchungen zur Stabilität der Parvulinfragment-Thioester	109
5.14	Einführung von Cystein-Schutzgruppen	110
5.15	Proteinanalytik	110
5.16	Bestimmung der PPIase-Aktivität	113
6	Literaturverzeichnis	115

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Ac	Acetyl-
Acm	Acetamidomethyl-
ACN	Acetonitril
AHPC	Alkylhydroperoxidreduktase
Am	4-Amidinophenyl-
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>b</i>	Harnstoffabhängigkeit der natürlich logarithmischen Spezifitätskonstanten
B	Dns, Dansyl-, (5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonyl-)
BAL	<i>backbone amide</i> Linker
BL-GSE	Glu-spezifische Endopeptidase aus <i>Bacillus licheniformis</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Bzl	Benzyl-
Bz	Benzoyl-
CBD	<i>Chitin Binding Domain</i> , Chitin-bindende Domäne aus <i>Bacillus circulans</i>
CD	Circulardichroismus
Ce	Carboxyethyl-
Cm	Carboxymethyl-
CT	C-terminal
Cyp	Cyclophilin
Da	Molekulargewicht in g mol ⁻¹
DCM	Dichlormethan
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
EA	Acylenzym, Ac-E bzw. E-Ac
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEL	<i>Expressed Enzymatic Ligation</i>
EH	Enzym
EP	Enzym-Produkt-Komplex
EPL	<i>Expressed Protein Ligation</i>
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> , Elektrosprayionisation
ESR	<i>Electron Spin Resonance</i> , Elektronenspinresonanz
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i> , Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FK506	Tacrolimus
FKBP	FK506-bindendes Protein
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> , Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
Gp	4-Guanidinophenyl-
GST	Glutathion-S-Transferase
<i>h</i>	<i>human</i>
H	Harnstoff

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol [4,5- <i>b</i>]pyridin-1-ylmethylen]- <i>N</i> -methylmethanaminiumhexafluorosphat- <i>N</i> -Oxid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , humaner Immunschwäche-Virus
HN	Nukleophil bzw. Acylakzeptor
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
Ht31	<i>protein kinase A anchoring protein</i>
HX	Esterabgangsgruppe
IgG	Immunglobulin G
IMPACT	<i>Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag</i>
Intens.	relative oder absolute Intensität
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante
<i>K</i>	Gleichgewichtskonstante
<i>k</i> _{kat}	Katalysekonstante
<i>k</i> _{kat} / <i>K</i> _M	Spezifitätskonstante
<i>K</i> _M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	<i>Luria Broth</i>
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i> ; Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation
MBP	Maltose-bindendes Protein
MD	Massedifferenz
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
MESNA	Mercaptoethansulfonsäure
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholin)-propansulfonsäure
<i>Mth</i> RIR1 Intein	Intein der <i>Ribonucleoside-diphosphate-reductase, α-subunit (RIR)</i> aus <i>Methanobacterium thermoautotrophicum (Mth)</i>
<i>Mxe</i> GyrA Intein	Intein der <i>DNA gyrase subunit A (GyrA)</i> aus <i>Mycobacterium xenopi (Mxe)</i>
<i>m/z</i>	Verhältnis von Molekülmasse zu Ionenladung
NCL	<i>Native Chemical Ligation</i> , Natürlich Chemische Ligation
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernspinresonanz
<i>nonsense</i> Codon	Stop Codon
NPY	Neuropeptid Y
NT	<i>N-terminal</i>
NTB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
p	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pam	4-Hydroxymethylphenylacetamidomethyl-
Par10	Parvulin (10,1 kDa Protein) aus <i>Escherichia coli</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert
PhOH	4-Hydroxyphenyl-
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> NA	4-Nitroanilid
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
PR	Protease
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytri(pyrrolidin)phosphoniumhexafluorosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rt	Retentionszeit

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

S	Substrat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Sce</i> VMA1 Intein	Intein der <i>vacuolar ATPase subunit</i> (VMA) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Sce</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Se	Sulfonylethyl-
SPI	<i>Selective Pressure Incorporation</i>
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> , Festphasenpeptidsynthese
Suc	Succinyl-
t	Reaktionszeit
tBu	<i>tert</i> -Butyl-
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TI	tetraedrales Intermediat
TIS	Triisopropylsilan
Tricin	<i>N</i> -[Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
Trt	Trityl-
TS	Thioglykolsäure
U	Unit
UV	Ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
Vis	<i>visible</i> , sichtbar
V8-Protease	Glu-spezifische Endopeptidase aus <i>Staphylococcus aureus</i> Stamm V8
Wang	<i>p</i> -Alkoxybenzyl-Harz
X	Nal, β -(2-Naphthyl)-L-alanin
Xa	Blutgerinnungsfaktor Xa, Alphaglobulin
XB	<i>Mxe</i> GyrA Intein-CBD
Xaa, Yaa	individuelle Aminosäuren
YB	<i>Sce</i> VMA1 Intein-CBD
Z	Benzyloxycarbonyl-

Aminosäuren wurden nach dem Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code entsprechend UPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur abgekürzt.

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Einleitung

Modifizierte Proteine spielen für das Studium biochemischer und medizinischer Fragestellungen eine große Rolle. So werden beispielsweise Proteine modifiziert, um die molekularen Grundlagen ihrer biologischen Aktivität zu untersuchen und Krankheiten, die mit diesen Proteinen assoziiert sein können, zu erforschen. Weiterhin dienen Enzymmodifizierungen dazu, katalytische Eigenschaften zu verbessern, Strukturveränderungen vorzunehmen oder *Tags* für eine effiziente Proteinreinigung anzufügen. Bedeutend sind ebenfalls Veränderungen, die zur Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen sowie zur Untersuchung von Katalysemechanismen, Protein-Protein- bzw. Protein-Ligand-Interaktionen oder Faltungsvorgängen führen. Eine hohe medizinische Relevanz kommt dabei der Erhöhung der Stabilität und Bioverfügbarkeit von Proteinen zu, die auf eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit abzielt.

Proteinmodifizierungen betreffen die Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren sowie das Peptidrückgrat. Außerdem können proteinogene Aminosäuren gegen unnatürliche Bausteine substituiert werden. Die Modifizierung von Aminosäureseitenketten wird zum Beispiel zur Erzeugung therapeutisch wirksamer Acylenzyme, Erhöhung der Proteinstabilität sowie Identifizierung von Aminosäureresten durchgeführt, welche in funktionsrelevante Bereiche involviert sind. Durch den Einsatz selektiver Modifizierungsreagenzien können Proteine denaturiert, in ihrer molekularen Dynamik beeinflusst oder an katalytisch essentiellen Resten blockiert werden, was zum vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität führen kann. So wird beispielsweise der aktive Serinrest in Serinproteasen und Esterasen durch Diisopropylfluorophosphat oder ähnliche Reagenzien [Jansen et al., 1949; 1950], das aktive Histidin in Serinproteasen durch Chlormethylketone [Schoellmann & Shaw, 1963; Powers, 1977] oder das aktive Histidin in pankreatischer Ribonuklease A durch Iodacetat bzw. verwandte α -Halogenalkansäuren [Crestfield et al., 1963; Heinrikson et al., 1965] inaktiviert. Von biopharmazeutischem Interesse ist die reversible Modifizierung des aktiven Zentrums von Serinproteasen, woraus therapeutische Acylenzyme resultieren. Eine nachfolgende langsame Deacylierung solcher Acylenzymintermediate führt zur Freisetzung des entsprechenden Therapeutikums. Als Beispiel sei Anistreplase genannt, ein *p*-Anisoyl-Lys-Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex (Eminase®), welche nach intravenöser Injektion infolge eines Herzinfarkts einer kontrollierten Deacylierung des katalytischen Zentrums der Serinprotease unterliegt, woraufhin die Fibrinolyse eingeleitet wird [Smith et al., 1981]. Dieses Konzept wurde ebenfalls von Wolf et al. [1995] zur Herstellung eines im aktiven

Zentrum acylierten Faktor Xa-Derivates eingesetzt. Eine weitere Anwendung stellt die Modifizierung der Lys-, Cys- oder Glu/Asp-Seitenketten von Proteinen mittels Polyethylenglykol (PEG) zur Reduktion der Antigenität sowie Erhöhung der Halbwertszeit therapeutisch aktiver Proteine *in vivo* dar [Übersicht in Delgado et al., 1992; Herman et al., 1995]. Zwei PEG-modifizierte Enzymderivate sind in der klinischen Therapie von besonderer Relevanz: die Adenosin-Deaminase [Hershfield et al., 1987], deren Mangel eine der Ursachen für ein Immunschwäche-Syndrom darstellt, und die L-Asparaginase [Keating et al., 1993]. Letztere wird zur Behandlung akuter lymphatischer Leukämie wie auch anderer maligner Tumore eingesetzt. In Tab. 1 sind weitere Beispiele für PEG-modifizierte Proteine mit therapeutischer Bedeutung zusammengefaßt. Neben der Anheftung von PEG stellt die Quervernetzung von Proteinen eine gebräuchliche Methode zur Erhöhung der Proteinstabilität dar. Während die intermolekulare Quervernetzung *in vivo* über Kollagen und Fibrin erfolgt, werden Formaldehyd und Glutaraldehyd *in vitro* eingesetzt [Khor, 1997]. Besonders in der Transplantationsmedizin können derartige Modifikationen die Verweilzeit von Transplantaten entscheidend verlängern.

Tab. 1: Ausgewählte Beispiele PEG-modifizierter Proteine.

Protein	Bemerkung	Referenz
Pepstatin	PEG-Modifizierung zur Entwicklung eines HIV-Proteaseinhibitors	Brygier et al., 1994
Interleukin-2	Klinische Prüfung	Wiernik et al., 1994
Tumornekrose Faktor- α	PEG-Modifizierung erhöht die Bioverfügbarkeit und reduziert Nebeneffekte, die mit dem unmodifizierten Protein beobachtet wurden. Die Untersuchungen wurden in Maus durchgeführt.	Tsutsumi et al., 1994, 1995

Außer den Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren kann ebenfalls das Peptidrückgrat modifiziert werden. Die Substitution einer Amid- gegen eine Esterbindung in Proteinen, zum Beispiel durch Einbau eines Milchsäurebausteins, ermöglicht Aussagen über den Einfluß von Wasserstoffbrückenbindungen unter Rückgratbeteiligung auf die Stabilität oder auch Aktivität eines Proteins [Jakubke, 1996]. Weiterhin sei die chemische Synthese eines Thioester-HIV-1-Protease-Analogons genannt [Baca & Kent, 1993]. Eine gegenüber dem Wildtyp verminderte katalytische Aktivität des modifizierten Enzyms, dem aufgrund des Austausches zweier Amid- gegen zwei Thioesterbindungen Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren fehlen, ließ vermuten, daß die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Enzym und Substrat wichtig

für die katalytische Funktion der HIV-1-Protease ist. Zusätzliche Möglichkeiten für Peptidrückgrat-Modifizierungen sind Deuterierungen und Thioxylierungen, wobei Thioxo-peptidbindungen zur Charakterisierung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen in Proteinen eingesetzt werden können [Wildemann, 2004].

Der Einbau nicht-proteinogener Aminosäuren in Proteine ist eine gebräuchliche Methode, um detaillierte Untersuchungen zur Konformation und zum Katalysemechanismus eines Enzyms vorzunehmen. Von besonderer pharmazeutischer Bedeutung ist dabei die Erhöhung der metabolischen Stabilität von Proteinen durch den Einbau von D-Aminosäuren. Ein großes analytisches Interesse besitzt die Einführung von molekularen Sonden wie isotope-markierter Verbindungen, Fluorophoren oder Spinlabeln in Proteine, woraufhin die modifizierten Biomoleküle der NMR-Spektroskopie, dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) oder ESR-Spektroskopie zugänglich werden. Folglich sind Untersuchungen zur Aufklärung von Proteinstrukturen sowie zur dynamischen Eigenschaft und Faltung eines Proteins mittels NMR, zum Katalysemechanismus sowie zur Substratbindung von Proteinen mittels FCS bzw. FRET sowie zu Protein-Ligand-Interaktionen mittels ESR möglich. Weiterhin finden unnatürliche Aminosäuren wie zum Beispiel α -Aminoisobuttersäure zur Modifikation der Proteinstruktur Anwendung [Jakubke, 1996].

Generell werden Proteine entweder während oder im Anschluß an ihre eigene Synthese modifiziert, wobei der Einbau nicht-proteinogener Aminosäuren sowie die Modifizierung des Peptidrückgrates in der Regel im Zuge ihrer Darstellung bewerkstelligt werden und die Modifizierung von Aminosäureseitenketten postsynthetisch erfolgt. Zur Synthese von modifizierten Proteinen können neben chemischen auch molekularbiologische Methoden wie die ortsgerichtete Mutagenese oder eine Kombination beider Strategien wie die *Expressed Protein Ligation* (EPL, [Muir et al., 1998]) eingesetzt werden, welche eine semisynthetische Version der *Native Chemical Ligation* (NCL, [Dawson et al., 1994]) darstellt und breite Anwendung findet. Allerdings wirkt sich die Notwendigkeit spezieller *N*-terminaler Aminosäurereste wie Cystein bzw. Cystein-Analoga limitierend auf die beiden letztgenannten Methoden aus. Da sich die Modifizierung der Proteinsequenz durch Standard-Mutagenese auf die 20 codierten Aminosäuren beschränkt, wurden weitere Strategien zur Einführung ungewöhnlicher bzw. unnatürlicher Aminosäuren in Proteine wie die Erweiterung des genetischen Codes durch Einsatz chemisch modifizierter Aminoacyl-tRNA's [Noren et al., 1989] sowie die *Selective Pressure Incorporation* (SPI), [Budisa et al., 1999] etabliert. Jedoch

sind diese Methoden nicht universell anwendbar und auch die chemische Synthese ist einer Limitation ausgesetzt, die sich vor allem in der begrenzten Anzahl von Aminosäuren in dem zu synthetisierenden Peptid äußert. Neben den genannten Techniken stellt der Einsatz von Proteasen als Biokatalysator zur Synthese von Peptiden und Proteinen vor allem aufgrund der Stereo- und Regiospezifität dieser Enzyme eine attraktive methodische Alternative dar. Am bisher eindrucksvollsten wurde dies durch die Synthese selektiv modifizierter RNase A mittels Subtiligase, einer optimierten Subtilisinvariante, gezeigt [Jackson et al., 1994]. Allerdings bedingt die Primärspezifität dieser Proteasevariante (Nomenklatur nach [Schechter & Berger, 1967]) den entscheidenden Nachteil der Methode, was sich in einer eingeschränkten Auswahl von Ligationsstellen widerspiegelt. Ein bahnbrechender Erfolg zur Umgehung des Spezifitätsproblems von Proteasen konnte durch die Entwicklung sogenannter Substratmimetika erzielt werden, deren Erkennung nicht wie bei herkömmlichen Substraten über die individuelle Aminosäure im S1-Bindungsort, sondern über eine spezifitätsvermittelnde Esterabgangsgruppe erfolgt (Übersicht in [Bordusa, 2002a]). In Kombination mit dem Einsatz modifizierter Proteasen, welche über eine verminderte proteolytische Aktivität verfügen, reflektiert das Substratmimetika-Konzept eine neue, vielversprechende Möglichkeit zur enzymatischen Synthese modifizierter Proteine.

1.2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Strategie zur Synthese modifizierter Proteine zu entwickeln, da bis zum heutigen Zeitpunkt keine universelle Methode zu deren Darstellung existiert. Aufgrund der genannten Vorteile von Substratmimetika in Enzym-katalysierten Reaktionen sollte in Kombination mit dem Einsatz modifizierter Proteasen mit verminderter proteolytischer Aktivität, die generelle Möglichkeit zur enzymatischen Substratmimetika-vermittelten Synthese modifizierter katalytisch aktiver Proteine demonstriert werden. Jedoch erfordert dieses Ziel die Bereitstellung längererkettiger Substratmimetika, wobei in Anlehnung an eine in Kooperation mit unserem Arbeitskreis kürzlich erschienene Arbeit zur Synthese eines Polypeptides [Machova et al., 2003] das Substratmimetikum durch Intein-vermittelte Synthese in Form eines rekombinanten Peptid-Thioesters hergestellt werden sollte. Dabei galt es einerseits, das Spektrum generierbarer Thioester zu erweitern, um geeignete Substratmimetika mittels Intein-Strategie herzustellen. Andererseits war es Aufgabenstellung, die Methode der *in situ* Generierung von Substratmimetika durch Umesterung eines Ausgangsesters auf rekombinante langkettige Substratmimetika zu übertragen.

Zur Untersuchung der synthetischen Relevanz rekombinanter Substratmimetika in Peptidligase-katalysierten Reaktionen sollte die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase) Parvulin 10 aus *E. coli* synthetisiert werden, welche durch Rahfeld et al. [1994a] entdeckt und deren Struktur durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurde [Kuhlewein et al., 2004]. Dieses Protein eignet sich als Untersuchungsgegenstand deshalb, weil es ein aus nur 92 Aminosäuren bestehendes, monomeres, biologisch aktives Biomolekül ist und damit vermutlich den Prototyp der PPIase-Familie der Parvuline darstellt, dessen Katalysemechanismus trotz Herstellung zahlreicher Proteinvarianten bislang ungeklärt ist [Schelbert, 1998]. Aufgrund der auffälligen Strukturhomologie zum *hPin1* wird für *E. coli* Parvulin 10 eine putative Substratbindungstasche vorgeschlagen, die einer Furche ähnelt und durch zwei antiparallele β -Faltblätter gebildet wird (Abb. 1). Fluoreszenzmarkierungen in der unmittelbaren Umgebung der putativen Substratbindungsstelle des Proteins wären von besonderem Interesse, um in Kombination mit ebenfalls fluoreszenzmarkierten spezifischen Liganden nicht nur ein rasches Spezifitätsscreening mittels Fluoreszenzspektroskopie durchzuführen, sondern darüber hinaus auch Rückschlüsse über die Art und Weise der Bindung im aktiven Zentrum ziehen zu können. Unter diesem Gesichtspunkt wurden für eine Fluoreszenzmarkierung von Parvulin 10 die Aminosäurereste Glutamin 80 und Tyrosin 90, welche sich am Rand der putativen Substratbindungstasche befinden, ausgewählt (Abb. 1). Dies sollte Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkierten Liganden ermöglichen, ohne die Katalyse zu beeinträchtigen.

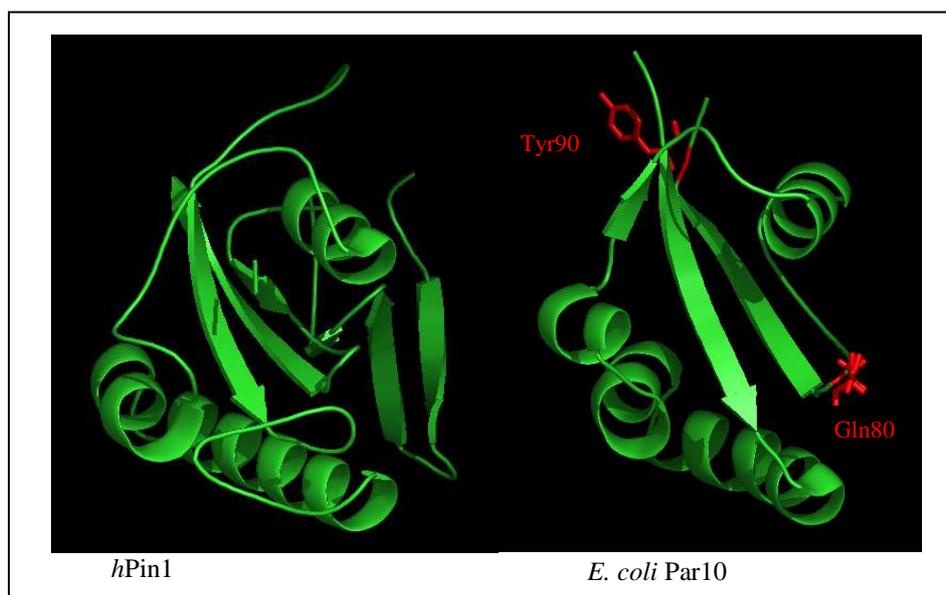


Abb. 1: Röntgenkristall- und NMR-Struktur von *hPin1* bzw. *E. coli* Par10. Aufgrund der Strukturhomologie zum *hPin1* wird für Parvulin 10 eine Substratbindungstasche vorgeschlagen, die einer Furche ähnelt und durch zwei antiparallel verlaufende β -Faltblätter gebildet wird [Kuhlewein et al., 2004]. Die für eine Fluoreszenzmarkierung ausgewählten Aminosäuren Gln80 und Tyr90 befinden sich jeweils am Rand der putativen Substratbindungstasche und sind rot gekennzeichnet. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Pymol. *hPin1*: 1PIN.pdb; *E. coli* Par10: 1JNT.pdb.

Prinzipiell galt es, die Anwendbarkeit der vorgestellten Synthesestrategie mittels initialer Modellreaktionen zu überprüfen und im Anschluß daran ein in der unmittelbaren Umgebung der putativen Substratbindungstasche fluoreszenzmarkiertes Parvulin herzustellen. Mit diesem Ziel sollte das Substratmimetikum rekombinant mittels Inteinstrategie und ein weiteres Fragment durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) bereitgestellt werden. Zur Ligation beider Fragmente sollten die in unserem Arbeitskreis eingesetzten bzw. erzeugten Enzyme V8-Protease (in Kombination mit Thioglykolsäure) und Trypsin D189K/K60E aufgrund ihrer signifikant verminderten proteolytischen Aktivität als Katalysatoren eingesetzt werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Synthese modifizierter Proteine

Obwohl die Totalsynthese kleinerer Proteine erfolgreich demonstriert werden konnte [Sieber et al., 1978; Akaji et al., 1985; Schneider & Kent, 1988; Woo et al., 1989; Zawadzke & Berg, 1993; Inui et al., 1996], stellt eine Längenlimitation von gegenwärtig etwa 50 Aminosäuren den entscheidenden Nachteil der chemischen Peptidsynthese sowohl in Lösung als auch an der festen Phase dar [Kent, 1988]. Für die Synthese längerer Proteine eignet sich die ortsgerichtete Mutagenese, die sich jedoch im Hinblick auf einführbare Modifizierungen naturgemäß auf den Einbau proteinogener Aminosäuren beschränkt. Für die rekombinante Einführung nicht-proteinogener Aminosäuren stehen zwei Methoden zur Verfügung: (i) die Neuordnung von Codons und (ii) die Erweiterung des genetischen Codes durch den Einsatz strukturell veränderter tRNA's (Suppressor tRNA). Die letztgenannte Methode basiert auf der Entdeckung von Organismen, welche die seltenen natürlichen Aminosäuren Selenocystein oder Pyrrolysin in Proteine einbauen, indem ein *nonsense* Codon zweckentfremdet wird [Chambers et al., 1986; Zinoni et al., 1986; Srinivasan et al., 2002]. Ein Durchbruch auf diesem Gebiet gelang Noren et al. [1989] mit Einführung der *Nonsense Suppression Mutagenesis*. Erfolgreich wurden durch Einsatz chemisch aminoacylierter Suppressor tRNA's unnatürliche Aminosäuren mit neuen sterischen und physikochemischen Eigenschaften als Antwort auf ein *nonsense* Codon mittels *in vitro* Translation ortsgerichtet in das Enzym β -Lactamase eingefügt. Einen bemerkenswerten Fortschritt erzielten Wang et al. [2001] durch Einsatz manipulierter *E. coli* Stämme, welche die Inkorporation neuer Aminosäuren in Proteine direkt in lebenden Zellen erlauben. Das Hinzufügen neuer Aminosäuren zum genetischen Repertoire *in vivo* erfordert zusätzliche Komponenten zum Proteinsyntheseparat. Es besteht die Notwendigkeit zur Konstruktion einer neuen tRNA (orthogonale tRNA), die nicht von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen von *E. coli* erkannt wird und welche die unnatürliche Aminosäure als Antwort auf ein *nonsense* Codon, welches für keine der 20 proteinogenen Aminosäuren codiert, trägt. Ebenso wird eine neue tRNA-Synthetase (orthogonale Synthetase) benötigt, welche ausschließlich die orthogonale tRNA aminoacyliert. Ein solches orthogonales tRNA/Synthetase-Paar wurde in *E. coli* durch Einführen des Tyrosyl-tRNA/Synthetase-Paares aus *Methanococcus jannaschii* erzeugt und führte zur *in vivo* Inkorporation der synthetischen Aminosäure *O*-Methyl-L-tyrosin [Wang et al., 2001]. Weiterhin wurden mittels dieser Methode die synthetischen Aminosäuren β -(2-Naphthyl)-L-alanin [Wang et al., 2002], *p*-Acetyl-L-phenylalanin [Wang et al., 2003a] sowie verschiedene Tyrosin-Analoga [Zhang et al., 2002; Wang et al., 2003b] in Proteine eingeführt.

Eine weitere eindrucksvolle Synthese demonstrierten Mehl et al. [2003] mit der Erzeugung eines Bakteriums, welches die zusätzliche Aminosäure *p*-Aminophenylalanin genetisch codiert und diese effizient in Proteine einfügt. Durch den Einbau neuer, genetisch codierter Aminosäuren ist es möglich, maßgeschneiderte Veränderungen in Proteinen und damit deren Struktur und Funktion direkt *in vivo* zu untersuchen. Kürzlich konnte auch der genetische Code für Eukaryoten erweitert werden [Chin et al., 2003a, b]. Ein grundsätzlicher Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, daß für jede unnatürliche Aminosäure eine neue Synthetase selektiert werden muß, welche ausschließlich die Suppressor-tRNA und die unnatürliche Aminosäure erkennt [Zhang et al., 2003]. Weiterhin sind der Import des Aminosäure-Analogons in den Organismus sowie dessen Ähnlichkeit in Größe und Struktur zur „normalen“ Aminosäure von Nachteil. Aufgrund dieser Limitationen folgten weitere Anwendungen, welche keine orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase benötigen und die die Basis zur Einführung eines breiteren Spektrums von Aminosäure-Analoga in Proteine darstellen, indem die aminoacylierte Suppressor-tRNA in lebende Zellen eingeführt wird [Nowak et al., 1998; Köhler et al., 2001].

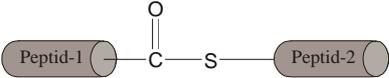
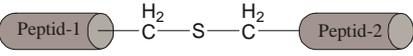
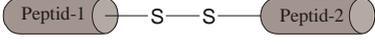
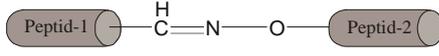
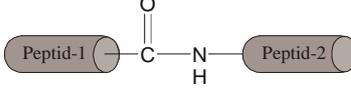
Eine zusätzliche Möglichkeit zur Inkorporation nicht-proteinogener Aminosäuren in Proteine bietet die bereits genannte Methode der Neuordnung von Codons *in vivo*, woraus ein erweitertes Aminosäurerepertoire resultiert. Dies erreichte man durch den Einsatz von Aminosäure-Analoga, welche ihre natürlichen Gegenspieler imitieren [Übersicht in Budisa et al., 1999]. Praktisch bedient man sich dabei der sogenannten *Selective Pressure Incorporation* (SPI), welche für den Einbau unnatürlicher Aminosäuren auxotrophe *E. coli* Stämme nutzt, die einem Selektionsdruck ausgesetzt werden. Den natürlichen Aminosäuren strukturell und chemisch ähnliche Substrat-Analoga können aufgrund der erweiterten Substratspezifität der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen der verwendeten auxotrophen *E. coli* Stämme aktiviert werden. Infolge des starken Selektionsdruckes wird eine neue Codonzuordnung ermöglicht, was zu Veränderungen in der Interpretation des genetischen Codes führt (Tab. 2). So wurden zum Beispiel die Codierungsmöglichkeiten des Tryptophan-Triplets UGG um die synthetischen Aminosäuren 4-, 5- und 6-Fluortryptophan, 7-Azatriptophan und 5-Hydroxytryptophan erweitert, wenn ein Tryptophan-auxotropher *E. coli* Stamm als Expressionswirtszelle dient. Mittels dieser Methode wurde kürzlich eine neue Klasse maßgeschneiderter GFP Proteine hergestellt [Bae et al., 2003].

Tab. 2: Engineering des genetischen Codes durch Erweiterung der Codierungsmöglichkeit unter experimentell ausgeübtem selektiven Druck nach Budisa et al. [1999].

Codon	Aminosäure	
	proteinogen	nicht-proteinogen
AUG	Methionin	Selenomethionin, Telluromethionin, Ethionin, Norleucin
UGG	Tryptophan	4-, 5- und 6-Fluortryptophan, 7-Azatriptophan, 5-Hydroxytryptophan
UU(U/C)	Phenylalanin	<i>o</i> -, <i>m</i> - und <i>p</i> -Fluorphenylalanin, Thienylalanin
UA(U/C)	Tyrosin	<i>m</i> -Fluortyrosin
CC(U/C/A/G)	Prolin	Thioprolin
UG(U/C)	Cystein	Selenocystein

Die chemische Synthese von Peptiden wird vorzugsweise durch schrittweise Festphasenpeptidsynthese (SPPS) realisiert [Merrifield, 1986]. Allerdings führen nicht-quantitativ verlaufende Kupplungsreaktionen besonders bei längeren Sequenzen zur Bildung von Nebenprodukten, deren Akkumulation die Länge der synthetisierbaren Polypeptidkette einschränkt. Diese Längenlimitation führte zur Einführung chemischer Ligationsverfahren, wobei die gängigsten im Folgenden beschrieben werden. Gewöhnlich entsteht durch chemoselektive Ligation der reaktiven Funktionalitäten am *C*- bzw. *N*-Terminus zweier Peptidfragmente eine Ligationsstelle nicht-peptidischen Charakters (Tab. 3). Schnolzer und Kent synthetisierten 1992 erfolgreich ein Analogon der HIV-1-Protease. Dazu wurden die Peptidsegmente HIV-1-PR(1-51) mit einem zusätzlichen Glycin- α -thiocarbonsäure-Rest am *C*-Terminus und HIV-1-PR(53-99) mit Acetyl bromid am *N*-Terminus mittels schrittweiser Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Durch den nukleophilen Angriff des Schwefelatoms des *N*-terminalen Fragmentes am Alkylbromid des *C*-terminalen Fragmentes wurden beide Segmente über einen Peptidbindungs-analogen Thioester kovalent miteinander verbunden. Eine deutliche Limitation dieser Methode besteht neben der artifiziellen Verknüpfung beider Fragmente in der Hydrolyseanfälligkeit des synthetisierten Proteins. Chemisch robuster sind im Gegensatz dazu Thioetherverbindungen, deren Synthese durch Englebretsen et al. [1995] am Beispiel eines enzymatisch aktiven HIV-1-Protease-Analogons erfolgreich demonstriert wurde. Baca et al. zeigten im selben Jahr mit der Synthese nativer homodimerer HIV-1-Protease, daß die Disulfidligationsstrategie eine praktikable Anwendung für die chemische Proteinsynthese darstellt. Eine weitere Möglichkeit der Verknüpfung zweier Fragmente besteht in der Ausbildung einer Oximbindung an der Verknüpfungsstelle durch Reaktion eines Aldehyds mit einem Aminoxyacetyl-Rest [Rose, 1994]. Durch den Einsatz von Polyaldehyd-Polypeptid-Templaten wurden homogen verzweigte Polypeptide in Form von Polyoximen bis zu 195 Aminosäuren Länge und 20 kD molekularer Masse synthetisiert.

Tab. 3: Etablierte chemische Strategien zur Ligation von Peptidfragmenten.

Ligationsstrategie	Bindungsmotiv	Referenz
Thioesterligation		Schnolzer & Kent, 1992
Thioetherligation		Englebretsen et al., 1995
Disulfidligation		Baca et al., 1995
Oximligation		Rose, 1994
Orthogonale Ligation NCL ¹ , EPL ² , Staudinger Ligation		Tam et al., 1999; Dawson et al., 1994; Muir et al., 1998; Evans et al., 1998; Nilsson et al., 2000; 2003

¹NCL: *Native Chemical Ligation*; ²EPL: *Expressed Protein Ligation*

Ein entscheidender Fortschritt in Richtung Fragmentligation über Knüpfung einer Amidbindung gelang Tam et al. mit Einführung der orthogonalen Ligationsstrategie [Tam & Yu, 1998; Tam & Lu, 1998; Tam et al., 1999]. Hierbei ist der eigentlichen Bildung der Peptidbindung mittels intramolekularem Acyltransfer eine chemoselektive Reaktion der beiden Peptidsegmente vorgelagert, wodurch eine Annäherung des C-Terminus des einen und des N-Terminus des anderen Peptidsegmentes erreicht wird (Abb. 2).

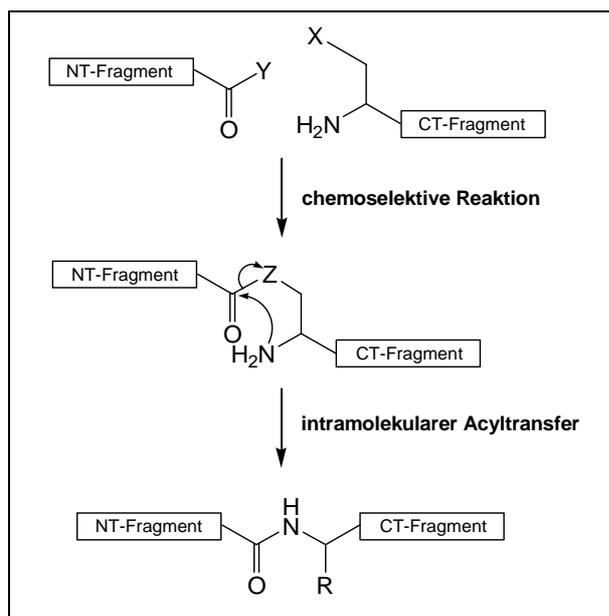


Abb. 2: Allgemeines Konzept der orthogonalen Ligationsstrategie. NT, N-terminal; CT, C-terminal; X und Y: reaktive Funktionalitäten am N- bzw. C-Terminus beider Fragmente, deren Reaktion zur Ausbildung von Z führt. R, Seitenkette.

Auf diesem allgemeinen Prinzip der sogenannten „Molekülklammer“ basiert auch die Staudinger Ligation, bei der die Amidbindung ausgehend von einem Azid und einem funktionalisierten Phosphin gebildet wird [Nilsson et al., 2000; Saxon & Bertozzi, 2000]. Chemische Grundlage hierfür ist die Reaktion von Alkylaziden mit Triarylphosphinen zu Azayliden. Die nachfolgende intramolekulare Acyltransferreaktion erfolgt effizient und eine Amidbindung wird gebildet, vorausgesetzt das Azaylid ist einem Ester oder Thioester benachbart. Eine sich anschließende Hydrolyse setzt das ligierte Produkt sowie das Phosphinoxid frei (Abb. 3). In Kombination mit der *Native Chemical Ligation* gelang mit dieser Methode unter anderem die Einführung eines Isotopen-markierten Prolinrestes in RNase A [Nilsson et al., 2003].

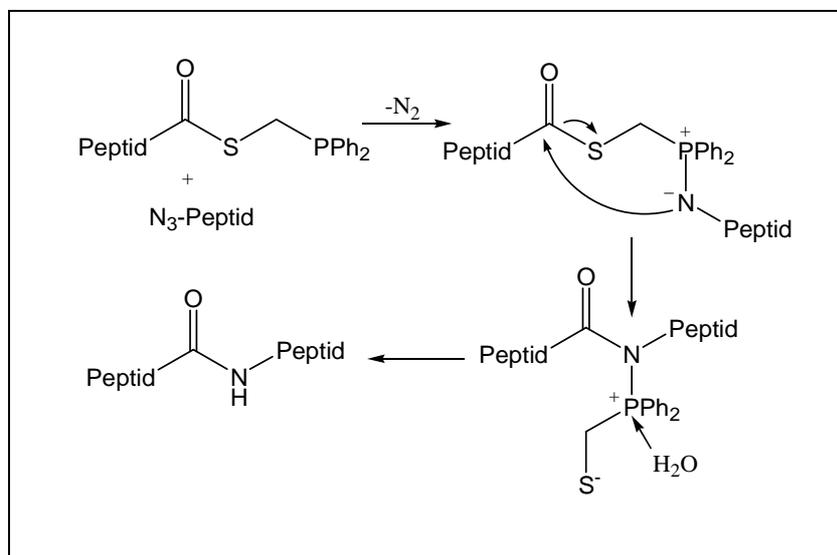


Abb. 3: Reaktionsmechanismus der Staudinger Ligation. Ein Peptid mit einem C-terminalen Phosphinothioester reagiert mit einem Peptid, welches ein N-terminales Azid enthält. Als erstes Intermediat entsteht ein Iminophosphoran, welches sich zu einem Amido-phosphoniumsalz umlagert. Eine anschließende Hydrolyse führt zu einem Amid.

Eine bemerkenswerte Erweiterung der chemischen Ligation mittels Thioesterbindung gelang Dawson et al. [1994] mit der Optimierung der bereits genannten *Native Chemical Ligation*, welche ursprünglich von Wieland und Brenner entwickelt wurde [Wieland et al., 1953; Brenner et al., 1957]. Bei dieser Methode findet zwischen einem synthetischen Peptid- α -Thioester (kurz Peptid-Thioester) und einem weiteren Peptidsegment, welches N-terminal ein Cystein trägt, eine chemoselektive Ligrationsreaktion statt (Abb. 4). Durch den nukleophilen Angriff der Seitenkette des Cysteins des N-terminalen Peptides 2 auf das Carbonyl-C-Atom des Peptid-Thioesters entsteht dabei in einer ersten Reaktion ein intermediärer Thioester, welcher sich durch eine spontane und schnelle Reaktion nachfolgend in eine native Peptidbindung umlagert. Neben Cysteinen können auch andere Reste wie Homocystein [Tam & Lu, 1998], Selenocystein [Gieselman et al., 2001; Hondal et al., 2001; Hondal & Raines, 2002], Selenohomocystein [Roelfes & Hilvert, 2003] und Histidin [Zhang & Tam, 1997] die

chemische Ligation vermitteln. Eine größere Auswahl von Ligationsstellen erreicht man durch Reduktion der C-S- [Yan & Dawson, 2001] oder C-Se-Bindung [Quaderer & Hilvert, 2002], nachdem die Amidbindung gebildet wurde, oder durch den Einsatz ablösbarer schwefelenthaltender Hilfsgruppen [Botti et al., 2001; Low et al., 2001; Offer et al., 2002]. Ein Vorteil der *Native Chemical Ligation* besteht in der möglichen Einführung von Modifizierungen innerhalb der gesamten Primärsequenz eines Proteins. Allerdings bleibt trotz der Erweiterungen die dennoch restriktive Ligationsstelle Nachteil der Methode.

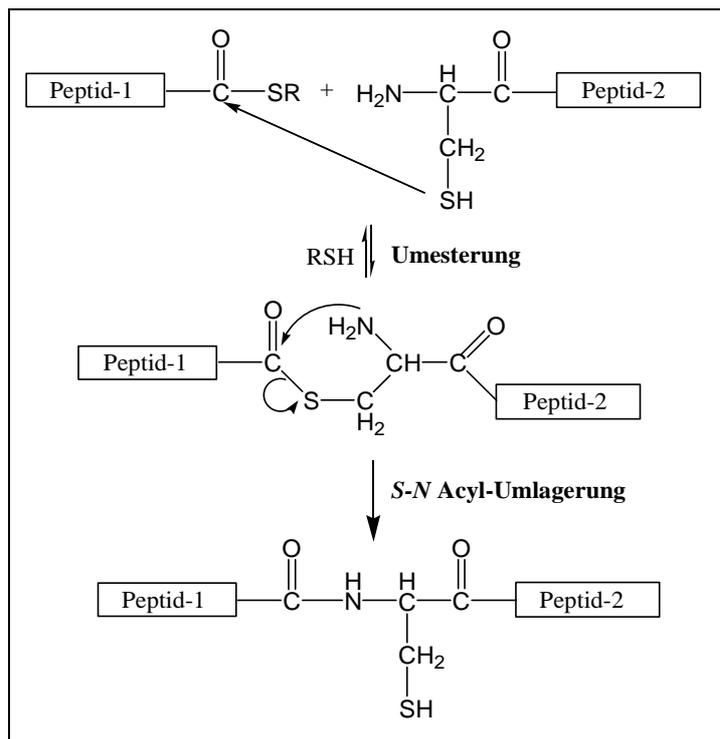


Abb. 4: Reaktionsmechanismus der Native Chemical Ligation. Aufgrund der Reaktion zwischen der Thioester-Funktion des einen sowie der Cystein-Seitenkette eines weiteren Peptidfragmentes entsteht zunächst ein intermediärer Thioester, welcher sich nachfolgend in einer raschen Reaktion spontan zu einer Peptidbindung umlagert [Dawson et al., 1994].

Die NCL bedarf der Bereitstellung peptidischer Thioester, welche chemisch oder rekombinant hergestellt werden können. Mittels Festphasenpeptidsynthese werden C-terminale Peptid-Thioester sowohl mittels Boc- als auch Fmoc-Chemie synthetisiert. Aufgrund der Basenlabilität von Thioestern werden diese vorzugsweise mittels Boc-Chemie hergestellt [Dawson et al., 1994; Tam et al., 1995], obwohl auch modifizierte Fmoc-Syntheserouten entwickelt wurden [Li et al., 1998; Clippingdale et al., 2000; Camarero et al., 2004]. Es werden etablierte Linker, wie 4-Hydroxymethylphenylacetamidomethyl- (Pam) bzw. *p*-Alkoxybenzylalkohol-Linker (Wang) [Swinnen & Hilvert, 2000] oder neuere wie *backbone amide* Linker (BAL) [Alsina et al., 1999] und Sulfonamid *safety catch* Linker [Ingenito et al., 1999; Shin et al., 1999; Quaderer & Hilvert, 2001] eingesetzt, wobei die Einführung der α -Thioester-Gruppe im Anschluß an die Kettenverlängerung erfolgt. Da diese Methoden wiederum der für die Festphasenpeptidsynthese typischen Längenlimitation von etwa 50 Aminosäuren unterliegen,

wurden weitere Anstrengungen zur Synthese peptidischer Thioestersubstrate unternommen. Ein bemerkenswerter Fortschritt in diese Richtung wurde durch die *Expressed Protein Ligation* erzielt, bei welcher der Peptid-Thioester rekombinant mittels Inteinstrategie hergestellt wird [Muir et al., 1998; Severinov & Muir, 1998; Evans et al., 1998].

Inteine sind natürlich vorkommende, interne Proteinsegmente, die ihr eigenes Herausschneiden aus einem inaktiven Präkursorprotein mit nachfolgender Ligation der beiden flankierenden Abschnitte, Exteine genannt, katalysieren [Perler et al., 1994; Xu & Perler, 1996; Perler et al., 1997; Gimble, 1998]. Dieser posttranslationale Prozeß wird als Protein-Spleißen bezeichnet und ist dem RNA-Spleißen, bei dem eine interne Sequenz (Intron) entfernt und die flankierenden Regionen (Exons) mittels 3', 5'-Phosphodiesterbindung verknüpft werden, formal analog. Wie bei den Zymogenen wird auch beim Protein-Spleißen ein inaktiver Präkursor aktiviert. Derartige posttranslationale Prozessierungsreaktionen können von anderen Proteinen katalysiert werden, wie im Fall der Zymogene oder Blutgerinnungsfaktoren durch hochselektive Proteasen, oder durch autokatalytische Umlagerungen der Peptidbindung vonstatten gehen. Neben dem Protein-Spleißen wurde für die Prozessierung von *Hedgehog* Proteinen, Pyrovoylenzymen sowie Glykosylasparaginase ein solcher autokatalytischer Prozeß beschrieben [Perler et al., 1997]. All diesen Reaktionen ist eine *N-S* bzw. *N-O* Acyl-Umlagerung an einem konservierten Cystein, Serin oder Threonin als Initiationspunkt für die Autokatalyse gemeinsam. Protein-Spleißelemente und die autoprozessierende Domäne von *Hedgehog* Proteinen verfügen über signifikante Struktur- und Sequenzhomologien, was eine evolutionäre Verwandtschaft vermuten läßt [Koonin et al., 1995]. RNA- und Protein-Spleißen können als alternative Methoden zur Expression unterbrochener Gene angesehen werden, wobei das Herausschneiden der internen Region für das Überleben des Organismus essentiell ist.

Inteine wurden in Eukaryoten sowie Eu- und Archaeobakterien identifiziert [Übersicht in Perler, 2002]. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind mehr als 100 Inteine bekannt, deren Sequenzen unter anderem die in Abb. 5 dargestellten konservierten Aminosäurereste beinhalten. Der Austausch der konservierten Aminosäuren Cystein bzw. Serin an der *N*-terminalen sowie Asparagin an der *C*-terminalen Spleißstelle des Inteins mittels ortsgerechter Mutagenese führte zum vollständigen Verlust der Spleißaktivität des Inteins [Xu und Perler, 1996; Chong et al., 1996]. Diese Untersuchungen und die Existenz von konservierten Aminosäureresten Cys, Ser oder Thr am *N*-Terminus des *C*-Exteins führten zum Standard-Mechanismus des Protein-Spleißens (Abb. 6), welcher durch vier aufeinander-

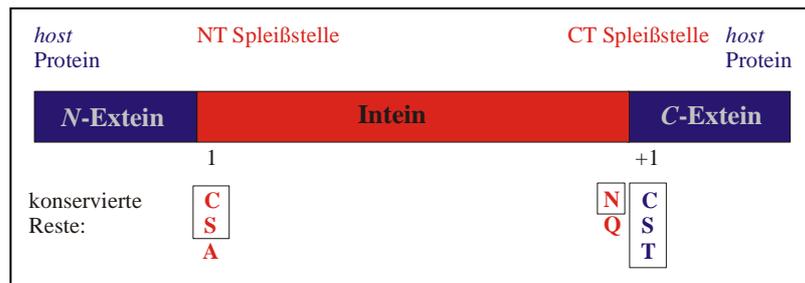


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Präkursorproteins und dessen konservierte Aminosäurereste. Die konservierten Aminosäurereste wurden mit dem Einbuchstabencode dargestellt. Eingerahmte Aminosäuren sind am Standard-Proteinspleiß-Mechanismus beteiligt (vgl. Abb. 6). Nicht eingerahmte Aminosäuren nehmen vermutlich an alternativen Spleiß-Mechanismen teil. NT, *N*-terminal; CT, *C*-terminal. Die Intein *N*-terminale Aminosäure stellt die Position 1 dar und die *N*-terminale Aminosäure des *C*-Exteins repräsentiert die +1 Position.

folgende nukleophile Reaktionen gekennzeichnet ist. Infolge des Angriffes einer nukleophilen Seitenkette von Cys₁ oder Ser₁ im ersten Reaktionsschritt auf das vorangehende Carbonyl-*C*-Atom kommt es zur Acyl-Umlagerung des *N*-Exteins an die Seitenkette der *N*-terminalen Aminosäure des Inteins. Das gebildete lineare (Thio)esterintermediat wird im Folgenden von der Seitenkette von Cys₊₁, Ser₊₁ oder Thr₊₁ am *N*-Terminus des *C*-Exteins angegriffen. Bei dieser Umesterungsreaktion wird das *N*-Extein zur *C*-terminalen Spleißstelle des Inteins übertragen. In einer dritten Reaktion wird die Peptidbindung am Intein-*C*-Terminus infolge einer Asn-Zyklisierung gespalten, was zur Freisetzung des Inteins führt. Im letzten Schritt erfolgt die spontane Umlagerung der (Thio)esterbindung zwischen den Exteinen zur thermodynamisch stabileren Peptidbindung.

Für Inteine mit einem Alaninrest (Ala₁) an der *N*-terminalen Spleißstelle existiert ein alternativer Proteinspleiß-Mechanismus, bei welchem der erste Schritt, die intramolekulare Acyl-Umlagerung, entfällt [Paulus, 2000; Noren et al., 2000]. Dieser Mechanismus beginnt demzufolge mit dem Angriff einer nukleophilen Seitenkette von Ser₊₁, Cys₊₁ bzw. Thr₊₁ am *N*-Terminus des *C*-Exteins auf das Carbonyl-*C*-Atom der Peptidbindung an der *N*-terminalen Spleißstelle und folgt in allen weiteren Schritten dem Standard-Spleißmechanismus.

Zur rekombinanten Herstellung von Peptid-Thioestern nutzt man das sogenannte IMPACTTM-CN-System (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*), welches ursprünglich zur einfachen und schnellen Reinigung von Proteinen entwickelt wurde [Chong et al., 1997, 1998a]. Es hat gegenüber anderen Affinitäts-Reinigungssystemen (Übersicht in [LaVallie & McCoy, 1995]) wie *Escherichia coli* Maltose-bindendes Protein, *Schistosoma japonicum* Glutathion-S-Transferase, His-Tag, Chitin-bindende Domäne und Antikörper

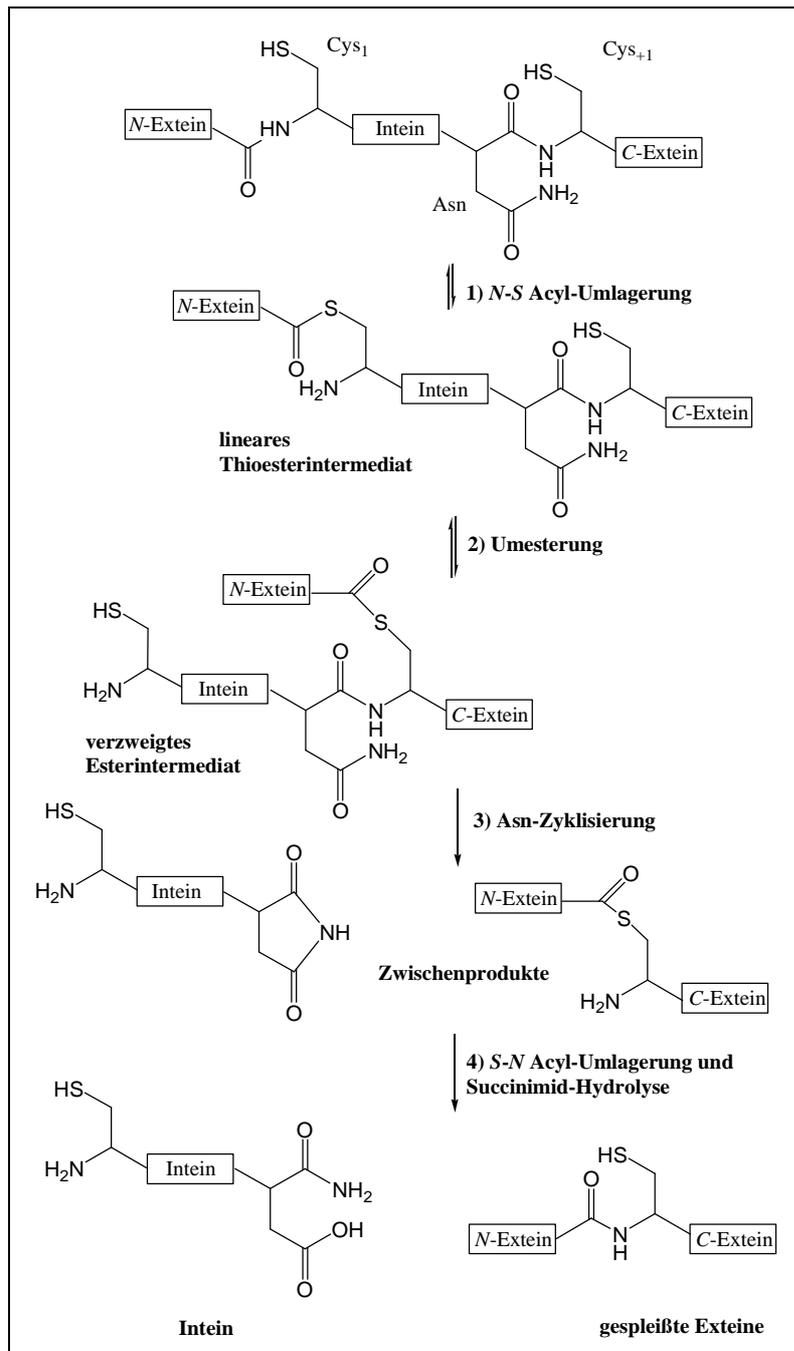


Abb. 6: Standard-Mechanismus des Protein-Spleißens. Dargestellt ist der Mechanismus des Protein-Spleißens mit Cystein an beiden Spleißstellen. Ebenso gilt dieser Mechanismus für die konservierten Aminosäurereste Ser am Intein-N-Terminus (Ser₁) und Ser bzw. Thr am N-Terminus des C-Exteins (Ser₊₁, Thr₊₁). Die autokatalysierte Reaktion verläuft über folgende 4 Schritte: 1) Bildung eines linearen Thioesterintermediates infolge einer N-S Acyl-Umlagerung durch den nukleophilen Angriff der Cys₁-Seitenkette auf das Carbonyl-C-Atom am C-Terminus des N-Exteins. 2) Bildung eines verzweigten Thioesterintermediates durch Angriff der Cys₊₁-Seitenkette des N-Terminus des C-Exteins. 3) Zyklisierung des Asparaginrestes am C-Terminus des Inteins und Spaltung der Peptidbindung. Als Zwischenprodukte entstehen das herausgeschnittene Intein mit einem C-terminalen Aminosuccinimidrest und beide Exteine, die über eine Thioesterbindung verknüpft sind. 4) Umlagerung der Thioesterbindung zwischen den Exteinen zu einer stabileren Amidbindung und Hydrolyse des Succinimids.

Epitop-Tags den Vorteil, keine Proteasen zur Spaltung des Intein-Fusionsproteins zu benötigen. Das Konzept der Reinigungsmethode basiert auf Untersuchungen zum Protein-Spleißmechanismus. Grundlage ist, daß aufgrund des Austausches des Asparaginrestes am C-Terminus des Inteins gegen Alanin die C-terminale Spaltung des Inteins blockiert ist, wohingegen die Spaltaktivität der N-terminalen Spleißstelle erhalten bleibt [Chong et al., 1996]. Befindet sich das modifizierte Intein zwischen einem zu synthetisierenden Protein und einem Affinitätsmarker (Chitin-bindende Domäne, CBD), katalysiert es eine N-S Acyl-Umlagerung am N-terminalen Cys₁ (Abb. 7). Die zwischen dem Protein und Cys₁ gebildete Thioesterbindung kann anschließend von Nucleophilen wie Thiolen (β -Mercaptoethanol, 1,4-Dithio-

threitol oder der Seitenkette eines Cysteinrestes) und Hydroxylamin angegriffen werden, was zur Bindungsspaltung und Freisetzung des Proteins führt [Chong et al., 1997]. Der Vorteil dieser Reinigungsstrategie besteht darin, daß rekombinante Proteine in nur einem Schritt mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden können. Da der Intein-CBD-Tag aufgrund der induzierbaren Spaltaktivität von Inteinen nach der Reinigung nicht am Protein gebunden bleibt, kann weiterhin auf eine Spaltung mit Proteasen verzichtet werden. Die Tatsache, daß im Fall einer Thiol-induzierten Spaltung das Peptid/Protein in Form eines C-terminalen Thioesters final eluiert wird (Abb. 7), führte 1998 zur Entwicklung einer neuen Ligationsstrategie zur Semisynthese von Proteinen [Muir et al., 1998; Severinov & Muir 1998; Evans et al., 1998]. Bei dieser sogenannten *Expressed Protein Ligation* wird ein Proteinfragment rekombinant als C-terminaler Thioester mittels Intein-Strategie hergestellt. Die eigentliche Ligationsreaktion bei der EPL Methode unterliegt dem Mechanismus der *Native Chemical Ligation*, wobei in analoger Weise die Seitenkette des N-terminalen Cysteins von Peptid-2 den C-terminalen Thioester von Peptid-1 nukleophil angreift und als Ergebnis beide Peptide durch eine native Peptidbindung miteinander verknüpft (vgl. Abb. 4). Die EPL Strategie stellt somit eine erweiterte semisynthetische Version der NCL dar.

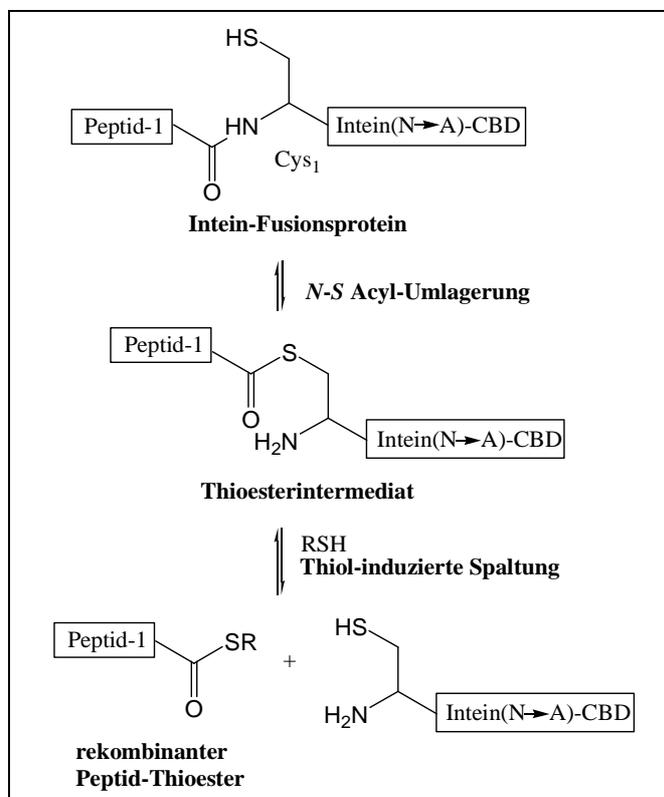


Abb. 7: Intein-vermittelte Synthese von rekombinanten Peptid-Thioestern. Das zu synthetisierende Peptid ist dem Intein, welches N-terminal ein Cystein trägt, direkt benachbart. Infolge einer intramolekularen *N-S Acyl-Umlagerung* entsteht zunächst ein intermediärer Thioester, welcher durch Zugabe von Thiolen gespalten werden kann. Die C-terminale Spleißstelle des Inteins wurde durch Austausch des C-terminalen Asparaginrestes gegen einen Alaninrest blockiert (*N→A*). Zur Proteinreinigung dient eine Chitin-bindende Domäne (CBD). Infolge der Thiol-induzierten Spaltung des Intein-Fusionsproteins kann das Peptid leicht als C-terminaler Thioester von einer Chitinsäule eluiert werden, während gespaltenes Intein-Tag auf dem Säulenmaterial zurückbleibt.

Tabelle 4 demonstriert Beispiele für biologisch relevante Proteine, die mittels EPL hergestellt wurden [vgl. Hofmann & Muir, 2002]. Die ortsgerichtete Einführung unnatürlicher Aminosäuren, molekularer Sonden und posttranslationaler Modifizierungen ermöglichte neue Einblicke in deren Enzymmechanismen, Proteinfaltung, -struktur und -funktion, Translation und Signaltransduktion (vgl. Referenzen in Tab. 4). Trotz dieser enormen Vorteile, welche die EPL mit sich bringt, wirkt sich nachteilig aus, daß die Ligationstelle auf Cystein beschränkt ist und die Thiol-induzierte Spaltung des Intein-Fusionsproteins von der C-terminalen Aminosäure an der Spaltstelle abhängt (vgl. Tab. 5).

Tab. 4: Anwendungen der *Expressed Protein Ligation* nach Hofmann & Muir [2002].

Protein	Untersuchungsgegenstand	Referenz
AP-1	Fe-EDTA Probe	Erlanson et al., 1996
c-Abl	Isotopenmarkierung, Fluoreszenz-Sonde	Xu et al., 1999
Calcitonin	C-terminale Amidierung	Cottingham et al., 2001
c-Crk	Fluoreszenz-Sonde, <i>backbone</i> -Zyklisierung	Hofmann et al., 2001 Camarero & Muir, 1999
Csk	Fluoreszenz-Sonde	Muir et al., 1998
GlyCAM-1	Glykoprotein	Macmillan & Bertozzi, 2000
<i>Hedgehog</i>	lipophile Modifizierung	Porter et al., 1996
<i>HpaI</i>	Semisynthese	Evans et al., 1998
KcsA	Semisynthese	Valiyaveetil et al., 2002
β -Lactamase	<i>backbone</i> -Zyklisierung	Iwai & Pluckthun, 1999
MBP	C-terminale Modifizierungen (Glykosylierung)	Chong et al., 1997 Tolbert & Wong, 2000
McbA	nicht-proteinogene Aminosäure	Roy et al., 1999
P21Max	Phosphorylierung	Kawakami et al., 2001
Rab	Fluoreszenz-Sonde	Iakovenko et al., 2000
RNAP β'	Fluoreszenz-Sonde	Mukhopadhyay et al., 2001
RNase A	Semisynthese und Selenocystein Ligation	Hondal et al., 2001 Evans et al., 1998
SHP-2	Phosphorylierung	Lu et al., 2001
σ^{70}	Semisynthese	Severinov & Muir, 1998
σ^A	Isotopenmarkierung	Camarero et al., 2002
Smad2	Phosphorylierung	Huse et al., 2001
Src	Tyrosin-Analoga	Wang & Cole, 2001
TBR-I	Phosphorylierung	Huse et al., 2000 Flavell et al., 2002
T4	Semisynthese	Evans et al., 1999a
T7 RNAP	C-terminale Modifizierungen	Lykke-Andersen & Christiansen, 1998
Thioredoxin	<i>backbone</i> -Zyklisierung, Polymerisierung	Evans et al., 1999b
ThiS	Semisynthese	Kinsland et al., 1998

AP-1: Aktivator Protein-1; c-Abl: Abelson-Protein-Tyrosinkinase; c-Crk: CT10 Regulator der Kinase; GlyCAM-1: Glykosylierungsabhängiges Zelladhäsionsmolekül 1; *HpaI*: Restriktionsendonuklease von *Haemophilus parainfluenzae*; KcsA: Kaliumkanal von *Streptomyces lividans*; MBP: Maltose-bindendes Protein; RNAP: RNA-Polymerase; SHP-2: Src-Homologie2-Protein-Tyrosin-Phosphatase; Smad: Sma/Mad- verwandtes Protein; Src: Rous-Sarkomavirus-Kinase; TBR-I: TypI-TGF β -Rezeptor; ThiS: Proteine in Form C-terminaler Thiocarboxylate für Untersuchungen zur Thiamin Biosynthese; T4: T4-DNA-Ligase.

Da alle vorgestellten chemischen und biologischen Methoden zur Herstellung modifizierter Proteine aufgrund ihrer jeweiligen Limitationen nicht universell einsetzbar sind, besteht ein Bedarf an attraktiven Alternativen. Der Einsatz enzymatischer Techniken zur Synthese modifizierter Proteine erscheint aufgrund der hohen Regio- und Stereospezifität, den hohen Reaktionsgeschwindigkeiten sowie milden Reaktionsbedingungen von Enzymen sehr vielversprechend. Da allerdings das ribosomale Enzymsystem eine Reihe von Faktoren zur Entfaltung der enzymatischen Aktivität benötigt und ebenso die nicht-ribosomale Peptidsynthese auf spezielle Anwendungen limitiert ist, verbleibt nur noch das reverse Hydrolysepotential von Proteasen, um durch Knüpfung einer Peptidbindung modifizierte Proteine zu erzeugen.

2.2 Protease-katalysierte Peptidsynthese

Neben den unter 2.1 genannten chemischen und biologischen Methoden zur Synthese modifizierter Proteine sind insbesondere Proteasen für die Peptidsynthese von großem Interesse. Gemäß ihrer *in vivo* Funktion als Hydrolasen spalten sie zwar die Peptidbindung nach einem spezifischen Aminosäurerest, können aber entsprechend der Reversibilität chemischer Reaktionen, die schon 1898 durch van't Hoff postuliert wurde, ebenso die Umkehrung dieses Hydrolyseprozesses katalysieren. Bei dieser sogenannten gleichgewichtskontrollierten Peptidsynthese liegt das Gleichgewicht unter nativen Bedingungen jedoch weit auf der Seite der Spaltprodukte. Allerdings kann dieses zum Beispiel durch Zugabe organischer Lösungsmittel in Richtung Syntheseprodukt verschoben werden [Homandberg et al., 1978].

Für Serin- und Cysteinproteasen ergibt sich darüber hinaus die Möglichkeit einer kinetisch kontrollierten Reaktionsführung, wobei die Hydrolyse natürlicher Peptid- oder herkömmlicher Estersubstrate über ein Acylenzymintermediat verläuft (Abb. 8). Enzym und Substrat assoziieren zunächst zu einem nicht-kovalenten Enzym-Substrat-Komplex (ES). Das Carbonyl-C-Atom der zu spaltenden Bindung wird von der Seitenkette des aktiven Serins oder Cysteins nukleophil angegriffen, woraufhin das erste tetrahedrale Intermediat (TI₁) entsteht. Dieses zerfällt in das Acylenzym EA und das Amin bzw. den Alkohol (Peptid oder synthetischer Ester als Substrat). Die Deacylierung des Acylenzyms wird durch den nukleophilen Angriff von Wasser initiiert und verläuft über ein zweites tetrahedrales Intermediat (TI₂), welches in den Enzym-Produkt-Komplex (EP) übergeht.

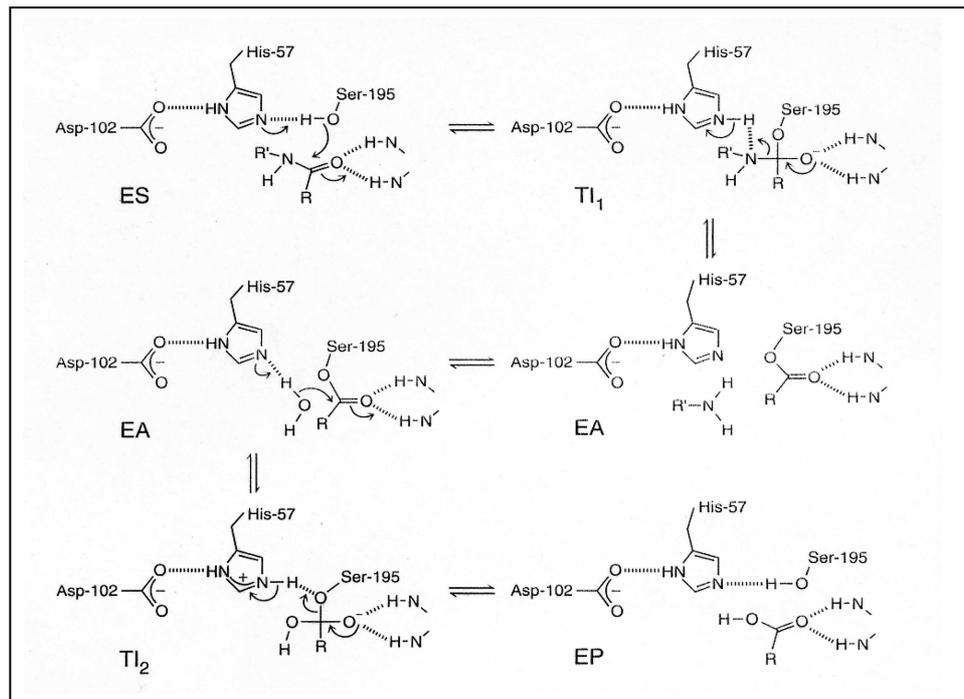


Abb. 8: Reaktionsmechanismus von Serin- und Cysteinproteasen am Beispiel des Chymotrypsins. ES, Enzym-Substrat-Komplex; TI₁, erstes tetrahedrales Intermediat; EA, Acylenzym; TI₂, zweites tetrahedrales Intermediat; EP, Enzym-Produkt-Komplex [Fersht, 1999].

Die Nutzung der kinetisch kontrollierten Reaktionsführung zur Synthese von Peptiden basiert auf der Tatsache, daß ein Acylenzym nicht ausschließlich von Wasser, sondern alternativ von peptidischen Nucleophilen (HN) angegriffen werden kann, welche in der enzymatischen Peptidsynthese als Aminokomponenten fungieren (Aminolysereaktion, Abb. 9). Aufgrund der signifikanten Verlagerung der Esterase- zur Amidaseaktivität solcher Acylenzym-bildenden Proteasen werden für die Knüpfung der Peptidbindung höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erhalten als für deren Spaltung, die konsequenterweise zur temporären Akkumulation des Peptidproduktes führen.

Die Protease-katalysierte Bildung der Peptidbindung stellt eine Zweisubstratreaktion dar. Während der Acyldonor (Ac-X) an die S-Bindungsgebiete des Enzyms bindet (Primärspezifität, Nomenklatur nach [Schechter & Berger, 1967]), wechselwirkt der Acylakzeptor (HN) mit den Protease-S'-Bindungsstellen (Sekundärspezifität). Im Gegensatz zur restriktiven Primärspezifität besitzen Proteasen in der Regel eine wesentlich variabelere Sekundärspezifität, was sich in einer breiten Anwendung möglicher Acylakzeptoren widerspiegelt. So werden neben klassischen Peptidderivaten sogar nicht-peptidische Aminoalkohole, Amine, Diamine und Aminozucker durch einige Proteasen effizient acyliert [Günther et al., 2000a; Pöhlmann, 2000; Wehofsky et al., 2002].

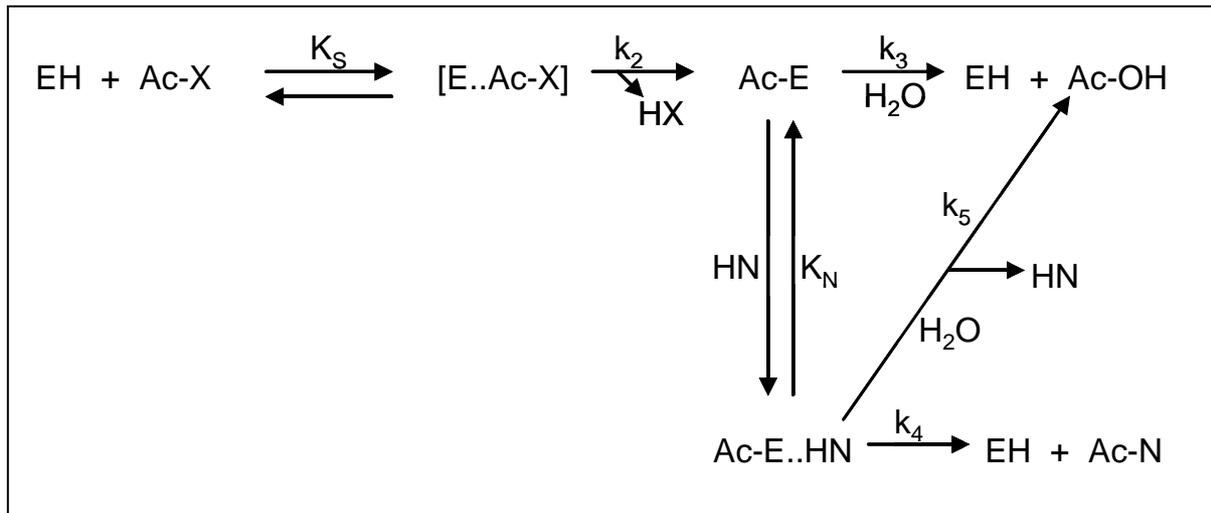


Abb. 9: Kinetisches Modell Protease-katalysierter Hydrolyse- und Aminolysereaktionen. Das Acylenzymintermediat kann sowohl von Wasser als auch von nukleophilen Aminokomponenten angegriffen werden. Daraus resultiert neben der Hydrolyse des Substrates die Bildung eines Aminolyseproduktes, in welchem das Substrat und das Nucleophil über eine Peptidbindung miteinander verbunden sind. EH, freies Enzym; Ac-X, Substrat; [E..Ac-X], Enzym-Substrat-Komplex; HX, Abgangsgruppe; Ac-E, Acylenzymintermediat; Ac-OH, Hydrolyseprodukt; HN, Acylakzeptor; Ac-N, Aminolyseprodukt.

Für die Protease-katalysierte Peptidsynthese existieren neben den schon genannten Vorteilen, die sich aus dem Einsatz von Enzymen ergeben, drei signifikante Nachteile: (i) die konkurrierende Hydrolyse des Acylenzyms, (ii) die eingeschränkte Primärspezifität sowie (iii) die Amidaseaktivität der Protease. Durch Methoden des *medium*, *substrate* und *enzyme engineering* ist es möglich, diese Nachteile zu umgehen [Übersicht in Bordusa, 2002b]. Da Proteasen sowohl den Acyltransfer auf Aminokomponenten als auch auf Wasser katalysieren, stellen sie keine perfekten Acyltransferasen dar. Damit steht der Deacylierung durch alternative Nucleophile die Hydrolyse des Acylenzymintermediates gegenüber, welche in Konkurrenz mit der Aminolyse tritt. Durch Zugabe organischer Lösungsmittel oder Reaktionen im gefrorenen wässrigen System (*medium engineering*) kann zwar der Wassergehalt und damit die Hydrolysereaktion vermindert werden, allerdings wirken sich veränderte Reaktionsmedien oft nachteilig auf die Enzymstabilität und -aktivität aus [Wong et al., 1990; Jakubke, 1994; Hänsler & Jakubke, 1996]. Alternativ kamen chemisch modifizierte Enzyme wie Thiosubtilisin [Nakatsuka et al., 1987] und Selenosubtilisin [Wu & Hilvert, 1989] zum Einsatz, die eine bevorzugte Aminolyse aufweisen (*enzyme engineering*).

Ein weiterer Nachteil für Protease-katalysierte Peptidsynthesereaktionen stellt die bereits genannte restriktive Primärspezifität der Protease dar, was die synthetische Anwendung als universelle Peptidligase *per se* ausschließt. Die strukturelle Anforderung an ein Protease-Substrat besteht in dem Vorhandensein einer spezifischen Aminosäure im Acylrest, im speziellen Fall Arg/Lys für Trypsin, Tyr/Phe für Chymotrypsin und Asp/Glu für V8-Protease,

obgleich auch die Esterabgangsgruppe die Aktivität der Protease beeinflusst. Obwohl durch die Einführung von Substratestern mit S1'-hochspezifischen Abgangsgruppen eine gewisse Akzeptanz wenig spezifischer Acylreste erzielt wurde [Imperiali & Abeles, 1987], gelang der Durchbruch in Richtung universelle Peptidsynthese mit der Entwicklung einer neuen Klasse maßgeschneiderter Substrate, die sich durch eine formale Verschiebung der spezifitätsdeterminierenden Gruppierung aus der C-terminalen Aminosäure in die Abgangsgruppe auszeichnen (Abb. 10). Aufgrund der Fähigkeit dieser Substrate, den spezifischen Aminosäurerest durch die Esterabgangsgruppe nachzuahmen, wurden sie Substratmimetika genannt [Bordusa et al., 1997]. Da es sich um die Knüpfung unspezifischer Acylreste handelt, ist die neu gebildete Peptidbindung nicht Gegenstand einer Sekundärhydrolyse.

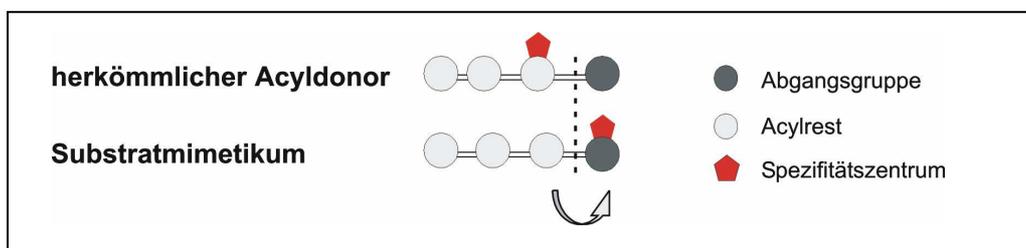


Abb. 10: Schematischer Aufbau eines herkömmlichen Acyldonors im Vergleich zu einem Substratmimetikum. Die spezifitätsdeterminierende Gruppierung ist aus der C-terminalen Aminosäure in die Abgangsgruppe des Estersubstrates verlagert.

Der Entwicklung von Substratmimetika gingen Studien zur Inhibierung Arginin-spezifischer Proteasen voraus, wobei sogenannte „inverse“ Ester als zeitabhängige irreversible Inhibitoren ihre Anwendung fanden [Wagner & Horn, 1973; Tanizawa et al., 1977]. Die ersten Beispiele für Substratmimetika waren die Acyl-4-amidino- und -4-guanidinophenylester, deren basische Amidino- bzw. Guanidino-Funktion die Basis der Erkennung durch die Arginin-spezifischen Proteasen Trypsin, Thrombin und Clostripain darstellen [Schellenberger et al., 1991; Sekizaki et al., 1996; 1997; 1998; Bordusa et al., 1997]. In weiteren Studien erfolgte die Übertragung des Substratmimetika-Konzeptes auf die Glu/Asp-spezifischen Proteasen V8 und BL-GSE (Substratmimetika des SCm und SCe-Typs, [Wehofsky & Bordusa, 1999; Wehofsky et al., 2000]) sowie auf die Tyr/Phe-spezifischen Proteasen Chymotrypsin und Subtilisin (Substratmimetika des OGP und SPhOH-Typs, [Günther et al., 2000b; Pöhlmann, 2000]), was die Universalität dieser Methode des *substrate engineering*s belegt (Abb. 11, Übersicht in [Bordusa, 2000; 2002a, b]).

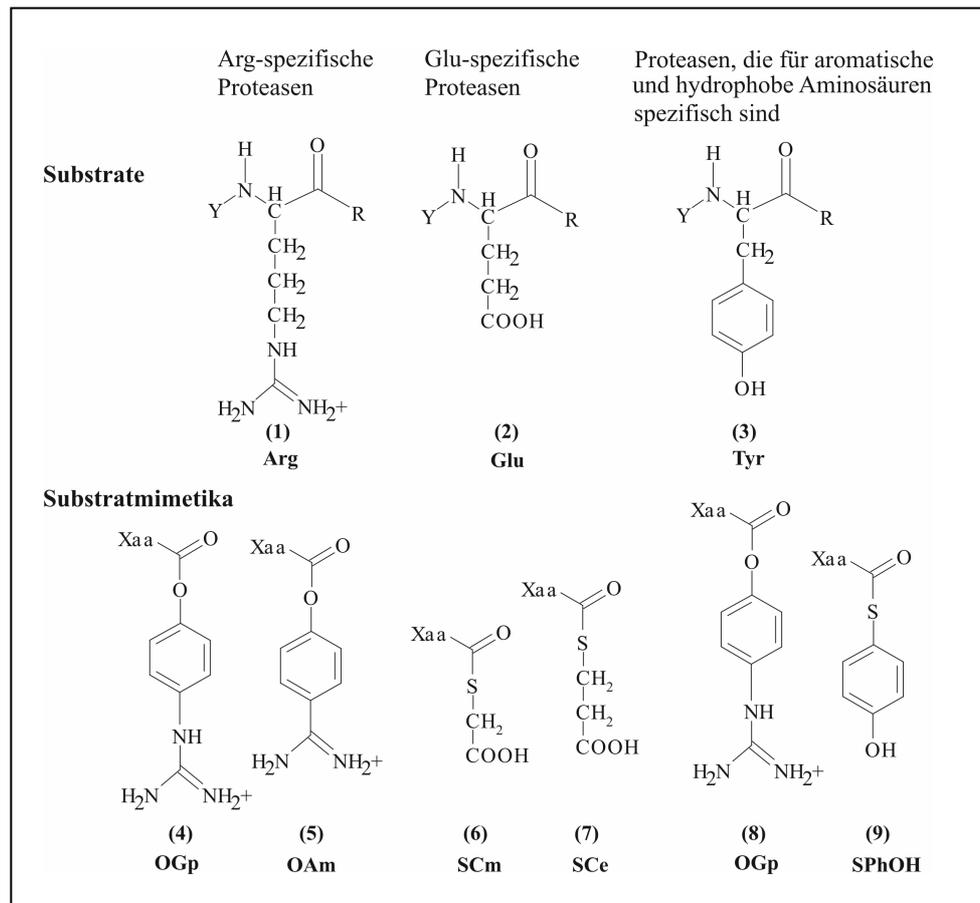


Abb. 11: Strukturen von Substraten und Substratmimetika für Arg- und Glu-spezifische Proteasen sowie für Proteasen, die für aromatische und hydrophobe Aminosäuren spezifisch sind. (1) Arginin, (2) Glutaminsäure, (3) Tyrosin, (4) 4-Guanidinophenylester (OGp), (5) 4-Amidinophenylester (OAm), (6) Carboxymethylthioester (SCm), (7) Carboxyethylthioester (SCe), (8) 4-Guanidinophenylester (OGp), (9) 4-Hydroxyphenylthioester (SPhOH), R, Sequenz in Richtung C-Terminus; Y, Sequenz in Richtung N-Terminus; Xaa, Aminosäure.

Auf der Basis von Hydrolyse- und Aminolysestudien sowie mittels Methoden des *Molecular Modeling* und der Moleküldynamik gelang es Thormann et al. [1999] am Beispiel von Trypsin, ein erweitertes kinetisches Modell für die Substratmimetika-vermittelte Proteasekatalyse aufzustellen (Abb. 12). Demnach bindet die Abgangsgruppe im S1-Bindungsort der Protease, während der Acylrest mit dem S'-Bereich interagiert. Diese reverse Einbindung des Substratmimetikums sollte folglich zur Bildung eines „umgekehrten“ Acylenzymintermediates führen, bei dem sich der Acylrest im S'-Bereich (E-Ac) befindet. Der Deacylierung des Acylenzyms durch Wasser oder ein anderes Nukleophil ist notwendigerweise eine Umlagerung des Acylrestes aus dem S'- in den S-Bereich vorgelagert, da die nukleophile Deacylierung einen unbesetzten S'-Bereich benötigt (Ac-E). Dieser zusätzliche Umlagerungsschritt zwischen den beiden Acylenzymen E-Ac und Ac-E ist durch

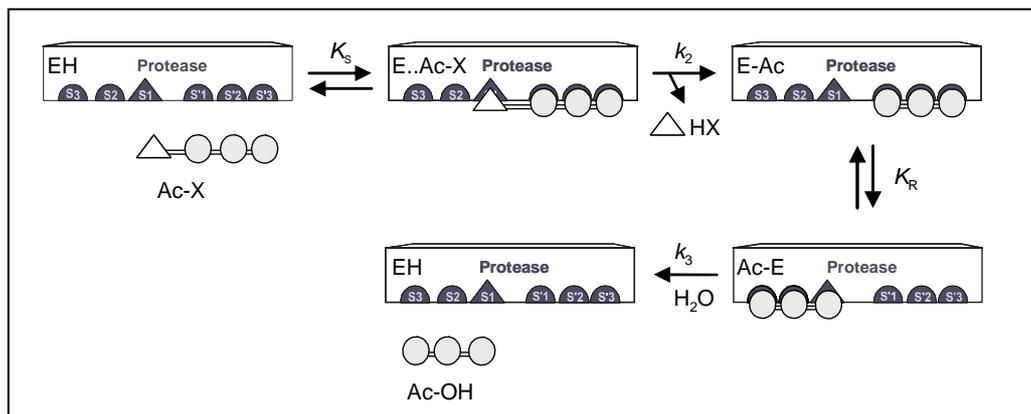


Abb. 12: Erweitertes kinetisches Modell der Protease-katalysierten Hydrolyse von Substratmimetika nach Thormann et al. [1999]. Dargestellt ist die reverse Einbindung des Substratmimetikums sowie die Umlagerung des Acylrestes beschrieben durch die Gleichgewichtskonstante K_R . EH, freies Enzym; Ac-X, Substratmimetikum; [E..Ac-X], Enzym-Substrat-Komplex; HX, Abgangsgruppe; E-Ac, Acylenzymintermediat mit Acylrest im S'-Bereich; Ac-E, Acylenzymintermediat mit Acylrest im S-Bereich, Ac-OH, Hydrolyseprodukt.

die Gleichgewichtskonstante K_R charakterisiert. Dieses Modell liefert neben Aussagen über die Erkennung und Einbindung der Substratmimetika durch das Enzym ebenfalls eine mögliche Erklärung ihrer Eignung für die enzymatische Peptidsynthese. Grundlage für letztgenannte ist die Annahme, daß peptidische Nukleophile aufgrund ihrer S'-spezifischen Bindung die Umlagerung des Acylrestes aus dem S'-Bereich stärker begünstigen als Wasser. Experimentell konnte diese Hypothese aufgrund beobachteter höherer Reaktionsgeschwindigkeiten für die Aminolyse als für die Hydrolyse des Acylenzyms bestätigt werden [Thormann et al., 1999].

Der kombinierte Einsatz von SPPS und Substratmimetika-Konzept ermöglichte nunmehr die Durchführung Protease-katalysierter Fragmentligationen unabhängig von der Primärspezifität des Enzyms. Mit Hilfe der Oximharz-Strategie wurden kurzkettige Peptidester synthetisiert, die als Acyldonoren in Trypsin-, Chymotrypsin- und V8-Protease-katalysierten Reaktionen eingesetzt wurden [Cеровsky & Bordusa, 2000]. Weiterhin konnte mit der Synthese der aus 24 Aminosäuren bestehenden funktionalen Domäne des Ht31 Proteins der Erfolg der Protease-katalysierten Fragmentligation demonstriert werden [Cеровsky et al., 2000]. Ein großer Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, daß für jede Protease in Abhängigkeit von ihrer individuellen Primärspezifität ein daran angepaßter Peptidester synthetisiert werden muss. Einen großen Fortschritt zur Umgehung dieser Limitation gelang Wehofsky et al. [2003] mit der *in situ* Generierung unterschiedlicher Substratmimetika-Typen durch Einsatz eines Methylthioesters als universellem Ausgangsester. Mittels Safety-Catch-Linker-basierter Festphasenpeptidsynthese wurde ein aus 10 Aminosäuren bestehender Methylthioester synthetisiert und für nachfolgende Umesterungsreaktionen mit Mercapto-

propionsäure, 4-Guanidinomercaptophenol und Benzylmercaptan eingesetzt (Substratmimetika für V8-Protease, Trypsin und Chymotrypsin). Unter Anwendung der letztgenannten Strategie wäre zwar die Darstellung längerkettiger Substratmimetika als Voraussetzung für die Protease-katalysierte Synthese modifizierter Proteine denkbar, allerdings wirkt sich bei dieser Methode die schon mehrfach genannte Längenlimitation chemisch synthetisierbarer Polypeptide nachteilig aus. Eine alternative Methode wurde kürzlich mit der rekombinanten Synthese längerkettiger Substratmimetika vorgestellt [Machova et al., 2003]. Hier diente ein aus 40 Aminosäuren bestehender Thioester als Substratmimetikum für die V8-Protease-katalysierte Synthese eines Carboxyfluoreszein-markierten proNPY-Analogons.

Der dritte Nachteil der Nutzung von Proteasen zur Peptid- und Proteinsynthese besteht in der bereits genannten unerwünschten Spaltung sensibler Peptidbindungen während der Synthese sowohl in den Edukten als auch im Peptidprodukt. Der Unterdrückung dieser sogenannten Amidaseaktivität von Proteasen kommt demnach eine enorme Bedeutung zu, da eine Überwindung dieser Limitation generell die enzymatische Synthese von Proteinen ermöglicht. Eine große Leistung gelang diesbezüglich Abrahmsen et al. [1991] mit der Erzeugung einer Doppelvariante von Subtilisin, der so genannten Subtiligase. Diese Variante, in der das katalytisch aktive Ser221 gegen Cys und Pro225 gegen Ala durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht wurde, konnte erfolgreich zur Totalsynthese von nativer und modifizierter RNase A eingesetzt werden [Jackson et al., 1994]. Der Nachteil dieses Biokatalysators ist in der Notwendigkeit begründet, mögliche Ligationsstellen aufgrund der eingeschränkten Enzymspezifität sorgfältig auszuwählen. Diese Limitation war Motivation für die Entwicklung von Peptidligasen, die ausgehend von Substratmimetika selektiv und unspezifisch Peptidbindungen knüpfen können, jedoch analog zur Subtiligase diese nicht mehr zu spalten vermögen (Abb. 13). Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe mittels ortsgerichteter Mutagenese eine Vielzahl von Trypsinvarianten hergestellt und hinsichtlich ihrer synthetischen Eigenschaften für die Substratmimetika-vermittelte irreversible Peptidsynthese untersucht [Rall, 2004]. Durch den Austausch von Asp189 und Ser190 gegen Ala resultiert eine Variante, welche praktisch keine Spaltaktivität gegenüber den ursprünglichen Trypsin-sensiblen Peptidbindungen zeigt, dafür aber nach Tyrosin moderat spaltet [Grünberg et al., 2000]. Der Austausch von Asp189 gegen Glu führte zur ersten Substratmimetika-spezifischen Peptidligase, die eine erhöhte relative Spezifität für Acyl-4-guanidinophenylester im Vergleich zu Lysyl- und Arginylbindungen aufweist [Xu et al., 2001]. Die bisher besten Ergebnisse wurden jedoch durch den Austausch von Asp189

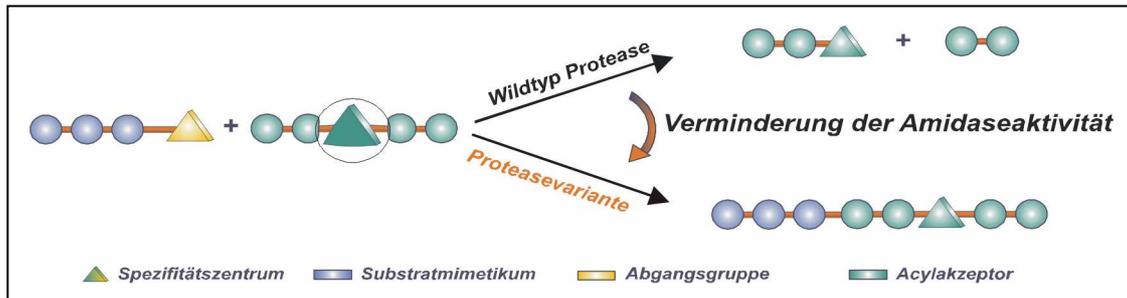


Abb. 13: Substratmimetika-vermittelte Ligation eines Protease-sensitiven Substrates mittels Wildtyp-Enzym bzw. einer optimierten Proteasevariante.

gegen Lys und Lys60 gegen Glu erhalten [Rall, 2004]. Aufgrund des Austausches des Asp 189, welches sich am Rand der S1-Bindungstasche befindet und für die Einbindung der spezifischen basischen Aminosäurereste Lys und Arg verantwortlich ist, gegen Lys resultiert ein Enzym mit einer deutlich verringerten proteolytischen Aktivität gegenüber ursprünglich Trypsin-spezifischen Substraten. Der Austausch des Aminosäurerestes Lys60, welcher sich in der S1'-Bindungstasche befindet, gegen einen sauren Glutaminsäurerest (Abb. 14) setzt die Amidaseaktivität des Katalysators im Vergleich zu Trypsin D189K weiter herab und erhöht die Spezifität des Enzyms gegenüber Substratmimetika des OGp-Typs [Rall, 2004]. Ebenfalls werden Substratmimetika mit 4-Hydroxyphenylthioester-Funktion ähnlich effizient umgesetzt (Bz-Gly-OGp: $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}=1,25 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; Bz-Gly-SPhOH: $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 5,53 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

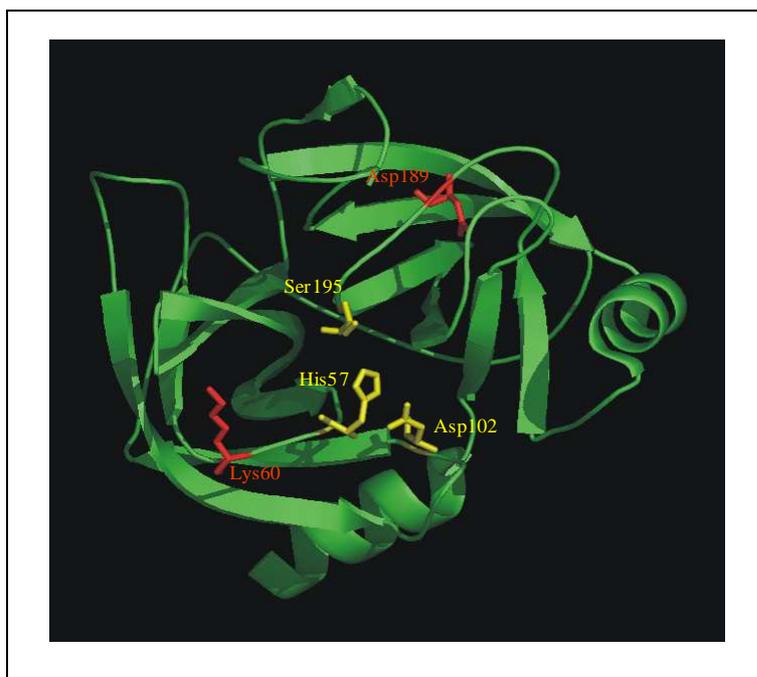


Abb. 14: Röntgenkristallstruktur des anionischen Trypsin II aus *Rattus norvegicus*. Die rot dargestellten Aminosäurereste Asp189 und Lys60 wurden gegen Lys bzw. Glu ausgetauscht. Die gelben Aminosäurereste kennzeichnen die katalytische Triade von Trypsin. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Pymol (1ANE.pdb).

Der Einsatz dieser Trypsinvariante in Fragmentligationen sowie zur selektiv *N*-terminalen Einführung von Markergruppen in Proteine (RNase A und *E. coli* Parvulin 10) belegen das hohe Synthesepotential des Enzyms [Rall, 2004]. Weiterhin diente die Trypsinvariante D189K/K60E als Ausgangspunkt zur Erzeugung von Histidin-spezifischem Trypsin mit dem Ziel, His-getaggte Proteine selektiv *N*-terminal zu modifizieren [Morawietz, 2003].

Neben der Erzeugung von Trypsinvarianten wurde in unserer Arbeitsgruppe ein weiteres Enzym, die Glu/Asp-spezifische V8-Protease aus *Staphylococcus aureus*, als potentielle Peptidligase identifiziert, da deren Amidaseaktivität durch Inkubation des Enzyms mit einem Überschuß an Thioglykolsäure reduziert wird [Wehofsky, 2000]. Dies erlaubte den Einsatz des nativen Enzyms in der sogenannten *Expressed Enzymatic Ligation* (EEL, [Machova et al., 2003]). Mit dieser Methode wurde kürzlich ein rekombinant erzeugtes Substratmimetikum mit einem synthetischen Peptid V8-Protease-katalysiert verknüpft und führte zur Synthese eines selektiv modifizierten Analogons des 69 Aminosäuren langen Prohormons des Neuropeptides Y.

2.3 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Die räumliche Struktur von Proteinen wird durch die Aminosäuresequenz festgelegt, deren kovalente Verknüpfung durch Peptidbindungen realisiert ist [Anfinsen, 1973]. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters von Peptidbindungen sind zwei stabile Konformationen existent, *cis* ($\omega = 0^\circ$) und *trans* ($\omega = 180^\circ$). Bedingt durch einen hochenergetischen Übergangszustand ist die Rotation um eine Peptidbindung mit einer Aktivierungsenergie von 60-100 kJ/mol verbunden. Diese hohe Rotationsbarriere der C-N-Bindung ist der Delokalisierung des freien Elektronenpaares des Peptidstickstoffatoms über die gesamte Peptidbindung zuzuschreiben und resultiert in einer langsamen Interkonversion beider Konformationen. Infolge sterischer Abstoßung der beiden benachbarten *C α* -Atome nimmt das *cis*-Konformer einen Zustand höherer Energie ein [Scherer et al., 1998], woraufhin der Anteil der Peptidbindungen in Proteinen, die in der *cis*-Konformation vorliegen, lediglich 0,03-0,05% beträgt [Stewart et al., 1990]. Die bevorzugte Einnahme der *trans*-Konformation der Peptidbindung wird neben diesen sterischen Behinderungen auch mittels elektronischer Effekte diskutiert [Hinderaker & Raines, 2003].

Prolin stellt die einzige Iminosäure unter den proteinogenen Aminosäuren dar und ist daher durch die Ausbildung einer Imidbindung gekennzeichnet, welche im Vergleich zur Amidbindung kein *N*-Proton und damit keine Wasserstoffbrückenbindungsdonor-

eigenschaften besitzt. In der Peptidyl-Prolyl-Bindung (kurz Prolyl-Bindung) wird durch die sterische Behinderung zwischen der δ CH₂-Gruppe des Pyrolidinringes und der Seitenkette des vorhergehenden Aminosäurerestes die Energiedifferenz zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Konformer auf 2-6 kJ/mol herabgesetzt (Abb. 15). In deren Folge resultiert eine geringere Grundzustandsenergie zur Stabilisierung der *cis*-Konformation in nativen Peptiden als auch Proteinstrukturen, woraufhin etwa 5-7% der Prolylbindungen in *cis*-Konformation gefunden werden [Stewart et al., 1990; Weiss et al., 1998].

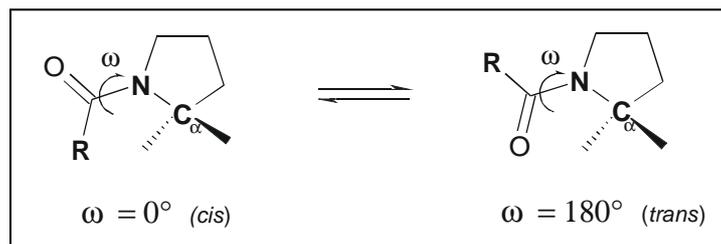


Abb. 15: *cis/trans*-Isomere der Prolylbindung.

Das erste Enzym, für welches eine Aktivität zur beschleunigten Isomerisierung von Prolyl-Bindungen experimentell nachgewiesen werden konnte, wurde 1984 von Fischer et al. beschrieben [Fischer et al., 1984a]. Entsprechend dieser Aktivität wurde das Enzym als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase; EC 5.2.1.8) bezeichnet. Seitdem wurden zahlreiche PPIasen in praktisch allen Organismen und subzellulären Kompartimenten identifiziert [Schreiber, 1991; Fischer, 1994; Galat & Metcalfe, 1995]. Man unterteilt die Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen in die drei Familien der Cyclophiline (Cyp), FK506-bindenden Proteine (FKBP's) und Parvuline. Die beiden erstgenannten Familien stellen zugleich Rezeptoren für Immunsuppressiva dar, wobei Cyclophiline das zyklische, aus Pilzen stammende Undekapeptid Cyclosporin A und FKBP's die immunsuppressiven Macrolide FK506 sowie Rapamycin binden. Juglon wurde als spezifischer irreversibler Inhibitor für Vertreter der Parvulin-Familie identifiziert [Hennig et al., 1998]. Die Inhibierung erfolgt im letztgenannten Fall durch eine kovalente Modifizierung von Cysteinresten, was zu einer partiellen Entfaltung des Proteins führt.

Obwohl die drei Familien der PPIasen interessanterweise keine Sequenzhomologien aufweisen, verfügen sie über eine Reihe von Gemeinsamkeiten. Alle Familien enthalten kleine Eindomänenenzyme (FKBP12, Cyp18, Par10), die sich durch hohe Isomerisierungs-Aktivitäten gegenüber Prolin-haltigen Peptiden auszeichnen ($k_{\text{kat}}/k_{\text{M}}$ bis zu $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [Harrison & Stein, 1992; Fischer, 1994; Rahfeld et al., 1994a]. Andererseits existieren in allen Familien Vertreter, die aus mehreren Domänen aufgebaut sind (FKBP52, Triggerfaktor,

Cyp40, SurA). Die Affinität zu den jeweiligen Substraten ist bei diesen Enzymen meist geringer ($k_{\text{kat}}/k_{\text{M}}: 10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Gendelektionsexperimente, die Identifizierung zellulärer Bindeproteine, die Konstruktion und Charakterisierung ortsspezifisch veränderter Varianten wie auch der Einsatz spezifischer Inhibitoren sind Methoden zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung von PPIasen. Durch derartige Experimente konnten eine Reihe biologischer Funktionen dieser Enzyme *in vivo* nachgewiesen werden. So sind PPIasen beispielsweise für zelluläre Prozesse wie die Proteinfaltung *in vivo* [Lazar & Kolter, 1996], den Transport von Proteinen [Galat & Metcalfe, 1995] und die virale Replikation [Thali et al., 1994; Sherry et al., 1998] von Bedeutung. Eine hohe biologische Relevanz besitzt humanes Pin1, welches an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist [Lu et al., 1996; Yaffe et al., 1997]. Für Cyclophiline und FKBP's wurden zelluläre Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren, Phosphatasen, Kinasen und Rezeptoren beschrieben [Walsh et al., 1992; Alarco & Heitman, 1997; Sherry et al., 1998; Alvarez-Arroyo et al., 2002; Übersicht in Andreeva et al., 1999]. Weiterhin katalysieren PPIasen die Proteinfaltung *in vitro*, in dem sie die geschwindigkeitsbestimmende Isomerisierung zugänglicher Xaa-Pro-Peptidbindungen beschleunigen [Schonbrunner et al., 1991; Lilie et al., 1993; Kern et al., 1995]. Dabei wird für einige PPIasen eine gegenüber Proteinsubstraten wesentlich geringere Aktivität als bei Peptidsubstraten beobachtet, da aufgrund der Struktur die Prolyl-Bindungen oft schwerer zugänglich sind [Schonbrunner et al., 1991; Harrison & Stein, 1992; Schmid et al., 1993; Fischer, 1994].

Hinsichtlich des für Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen geltenden Katalysemechanismus existieren in der Literatur verschiedene Modelle, von denen die drei wichtigsten in Abb. 16 zusammengefaßt sind. Basierend auf Messungen des kinetischen Lösungsmittelisotopen-effektes wurde ein kovalenter Mechanismus vorgeschlagen, welcher die Bildung eines tetrahedralen Intermediates der Bindungsrotation einschließt (Abb. 16A, [Fischer et al., 1989]). Obwohl beobachtet wurde, daß Cyp18 durch Thiol-modifizierende Reagenzien inaktiviert wird [Fischer et al., 1984a], konnte ein Mechanismus über ein kovalentes Hemithioorthoamid-Intermediat durch Mutation der vorhandenen Cysteinreste ausgeschlossen werden [Liu, 1990]. Im Gegensatz dazu legen enzymkinetische und kristallographische Daten von *hPin1* die Ausbildung eines tetrahedralen Intermediates nahe [Ranganathan et al., 1997]. Harrison und Stein schlossen aus kinetischen Lösungsmittelisotopeneffekten, daß der Übergangszustand der Cyp18-Katalyse nicht tetrahedral ist [Harrison & Stein, 1992]. Sie stellten ein Modell auf, welches die Bildung und Stabilisierung eines Übergangszustandes beschreibt, in welchem das Carbonylsauerstoffatom der Peptidyl-Prolyl-Bindung senkrecht zum Prolylring steht (Abb.

16B). Als Grundlage für das dritte Modell (Abb. 16C), das 1991 von Kofron et al. vorgeschlagen wurde, diente die Kristallstruktur des Cyp18-Substrat-Komplexes, welcher die unmittelbare Nähe der Guanidinogruppe von Arg55 zum Imid-Stickstoff des Prolins erkennen ließ [Zhao & Ke, 1996]. Daraus wurde geschlußfolgert, daß eine Interaktion des Imidstickstoffatoms mit einem Elektrophil zur Destabilisierung des partiellen Doppelbindungscharakters führt. Auf der Grundlage kinetischer Untersuchungen und struktureller Eigenschaften von humanem Cyp18 und *Escherichia coli* Parvulin 10 wurde kürzlich ein weiterer Katalysemechanismus vorgeschlagen, bei welchem die positive Partialladung des Carbonylkohlenstoffs der Prolyl-Bindung im Übergangszustand durch ein polarisiertes Wassermolekül stabilisiert wird [Fanghänel, 2005].

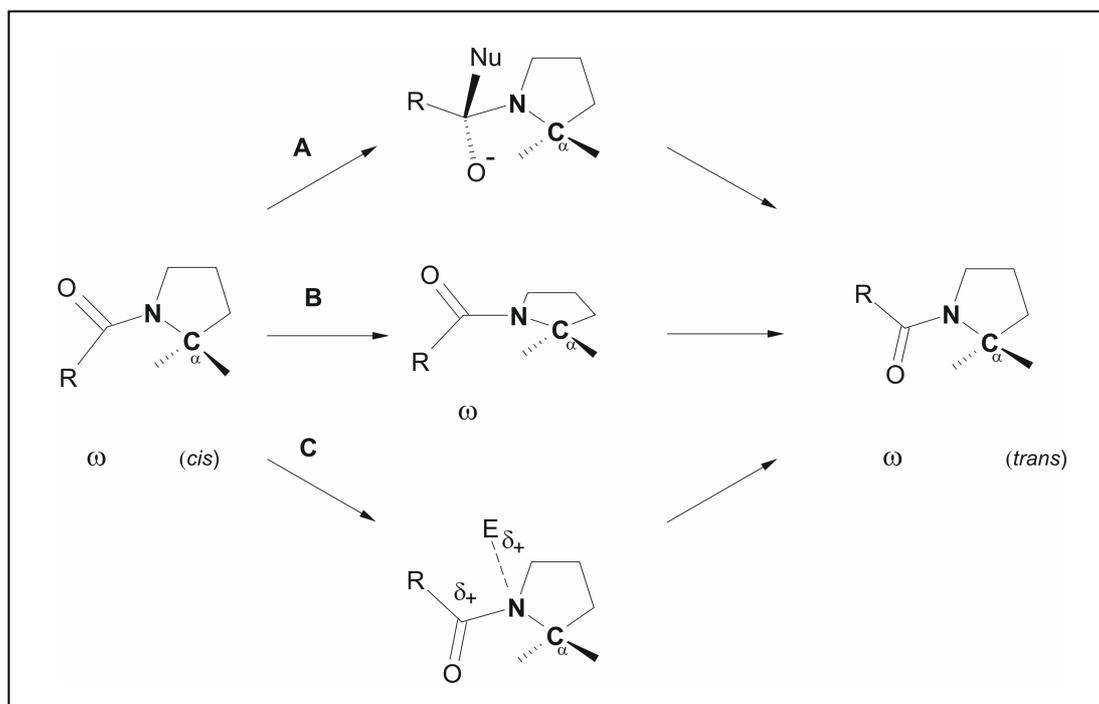


Abb. 16: Übersicht der drei wichtigsten in der Literatur vorgeschlagenen Katalysemechanismen von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen nach Fanghänel [2003]. **A)** Das Carbonyl-C-Atom der Prolyl-Bindung wird nukleophil angegriffen, woraufhin ein tetraedrales Intermediat entsteht (kovalenter Mechanismus). **B)** Bildung und Stabilisierung eines Übergangszustandes, bei dem das Carbonylsauerstoffatom senkrecht zur Ebene des Prolinrings steht. **C)** Destabilisierung des partiellen Doppelbindungscharakters durch Wechselwirkung des Imid-Stickstoffatoms mit einem Elektrophil.

Zur experimentellen Bestimmung der PPIase-Aktivität kann die Konformerspezifität einer Protease wie beispielsweise Chymotrypsin genutzt werden [Fischer et al., 1984b]. Die Spaltung von Substraten der Sequenz Suc-Ala-Xaa-Pro-Yaa-pNA erfolgt nach Yaa unter Freisetzung von 4-Nitroanilin, wenn sich die Xaa-Pro-Bindung in der *trans*-Konformation

befindet. Diese Reaktion kann mittels UV-Spektroskopie, basierend auf der Freisetzung von 4-Nitroanilin bei einer Wellenlänge von 390-405 nm, verfolgt werden. In der ersten, schnellen Phase dieser gekoppelten Reaktion spaltet die Protease das gesamte *trans*-Prolyl-Substrat (k_0). Die zweite, langsame Reaktionsphase wird durch die *cis/trans*-Isomerisierung limitiert und kann durch Zugabe von PPIasen beschleunigt werden. Da in diesem Test die Substratkonzentration klein gegenüber dem K_M -Wert ist, kann die Spezifitätskonstante k_{kat}/K_M der PPIase aus der Differenz der Geschwindigkeitskonstanten k_{beob} und der Geschwindigkeitskonstanten der unkatalysierten Reaktion k_0 sowie der PPIase-Konzentration $[PPIase]$ entsprechend Gleichung 2.1 berechnet werden.

$$\frac{k_{\text{kat}}}{K_M} = \frac{k_{\text{beob}} - k_0}{[PPIase]} \quad (2.1)$$

Weiterhin können Agenzien, welche die Lage des *cis/trans*-Gleichgewichtes der Xaa-Pro-Bindung verändern, zur Quantifizierung der katalytischen Effizienz von PPIasen ohne Hilfsprotease herangezogen werden [Janowski et al., 1997]. Eine Lösung von 0,55 M LiCl in Trifluorethanol beispielsweise erhöht den *cis*-Gehalt der Prolylbindungen in den erwähnten Tetrapeptiden signifikant. Der Extinktionsunterschied des Substrates zwischen der *cis*- und *trans*-Konformation der Prolylbindung wird nach einem Sprung aus diesem Lösungsmittelsystem in ein wäßriges zur UV/Vis-spektroskopischen Verfolgung der Wiederherstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes genutzt. Im Gegensatz zur Protease-gekoppelten Methode stellt hierbei die gemessene Geschwindigkeitskonstante die Summe der Einzelkonstanten der *cis*→*trans* und der *trans*→*cis* Isomerisierung dar.

2.3.1 Parvulin 10 - Prototyp der PPIase Familie der Parvuline

1994 entdeckten Rahfeld et al. eine Prolylisomerase im Cytoplasma von *E. coli*, welche weder durch Cyclosporin A noch durch FK506 gehemmt werden konnte [Rahfeld et al., 1994a, b]. Dieses Protein, bestehend aus 92 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 10,1 kDa, wurde Parvulin 10 (Par10) genannt (lat.: *parvulus*, sehr klein). Es stellt vermutlich den Prototyp, also die originale katalytische Maschinerie, der PPIase Familie der Parvuline dar. Parvulin 10 weist Homologien zu Domänen anderer Proteine innerhalb der Parvulinfamilie wie der von PrsA aus *Bacillus subtilis*, SurA aus *E. coli*, PrtM aus *Lactococcus lactis*, Ptf1/Ess1 aus Hefe und humanem Pin1 auf.

Parvulin 10 katalysiert die Isomerisierung der Prolyl-Bindung von Tetrapeptidsubstraten der Sequenz Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA mit einer Präferenz für hydrophobe Aminosäuren in der Position Xaa ähnlich effizient wie Cyclophiline [Scholz et al., 1997; Schelbert, 1998]. Die Substratspezifität ist somit der der FKBP's vergleichbar [Harrison & Stein, 1990]. Zusätzlich zur Aktivität gegenüber Prolin-enthaltenden Tetrapeptiden ist Parvulin ebenso wie Cyp18 und FKBP12 in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung von Xaa-Prolyl-Bindungen in Proteinen während ihrer Faltung zu beschleunigen. So zeigten Scholz et al. [1997], daß Parvulin die Faltung einer RNase T1-Variante mit einer Spezifitätskonstanten von $30000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ katalysiert. Die Faltung und Entfaltung des Parvulins selbst verläuft reversibel in einer Zweiphasenreaktion mit einer freien Gibbschen Stabilisierungsenergie von 28 kJ/mol bei 10 °C. Eine *cis*-Prolylbindung (Gly75-Pro76) in der nativen Struktur des Parvulin 10 hat eine Prolin-limitierte Faltungsphase zur Folge [Scholz et al., 1997; Kuhlewein et al., 2004]. Diese wird durch Parvulin selbst in einem autokatalytischen Prozeß während der Rückfaltung katalysiert [Scholz et al., 1997].

Für Parvulin 10 wurde die kleine Untereinheit der Alkylhydroperoxidreduktase (AHPC) aus *E. coli* als zellulärer Bindungspartner identifiziert [Schelbert, 1998]. Basierend auf diesem Befund und der Bedeutung von AHPC bei der zellulären Antwort gegenüber oxidativem Streß [Jacobson et al., 1989; Cha et al., 1995] vermutet man eine Beteiligung von Par10 an stressinduzierten Proteinfaltungs- und Stabilisierungsvorgängen in der Zelle [Schelbert, 1998].

Generell kommen Parvuline sowohl in Pro- als auch Eukaryoten vor. Während für prokaryotische Parvuline eine unterstützende Funktion bei der Faltung von Proteinen festgestellt wurde [Lazar & Kolter, 1996], sind eukaryotische Parvuline wie *hPin1* und *S. cerevisiae* Par19 (Ess1) an der Regulation der Transkription [Arevalo-Rodriguez et al., 2000; Wu et al., 2000] und der Kontrolle des mitotischen Zellzyklus [Lu et al., 1996; Winkler et al., 2000] beteiligt. Weiterhin wurde für das *Drosophila* Pin1 Homolog, das Dodo Protein, eine Beteiligung an phosphorylierungsabhängigen Signaltransduktionswegen festgestellt [Hsu et al., 2001]. Parvuline, die an solchen Prozessen teilnehmen, zeigen eine einzigartige Spezifität, da sie Substrate mit phosphorylierten Serin- oder Threonin-Resten *N*-terminal zum Prolin bevorzugen [Yaffe et al., 1997]. Abgeleitet aus der Röntgenkristallstruktur von *hPin1* vermutet man, daß drei basische Reste (K63, R68, R69) innerhalb der $\beta 1/\alpha 1$ -Schleife die Bindungsstelle für einen Phosphatrest bilden [Ranganathan et al., 1997]. Dies erklärt, warum *hPin1* außerordentlich spezifisch für in dieser Position negativ geladene Substrate ist. pSer/pThr-Pro spezifische Parvuline, ausgenommen die höherer Pflanzen, besitzen unter

anderem eine *N*-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die so genannte WW-Domäne. Neben *hPin1* wurde innerhalb des humanen Genoms ein zweites Parvulin, *hPar14*, identifiziert [Uchida et al., 1999], welches eine zum *hPin1* topologisch identische Anordnung der Sekundärstrukturelemente der PPIase-Domäne aufweist [Sekerina et al., 2000]. Für *hPar14* konnte nachgewiesen werden, daß die *N*-terminale Domäne dieses Proteins verantwortlich für die Bindung von DNA ist [Surmacz et al., 2002]. Kürzlich wurde die Struktur von Parvulin 10 mittels NMR-Spektroskopie in wässriger Lösung ermittelt (vgl. Abb. 14, [Kuhlewein et al., 2004]). Deren Analyse offenbart vier α -helikale Regionen und 4 antiparallele β -Faltblatt-Motive. Das β -Faltblatt 1 bildet den *N*-Terminus und wird gefolgt von den α -Helices 1-3. Eine *loop*-Region separiert das β -Faltblatt 2 von der α -Helix 4. Die β -Faltblätter 3 und 4 bilden schließlich den *C*-Terminus von Parvulin 10. Das dritte β -Faltblatt enthält die bereits erwähnte Gly-Pro-*cis*-Peptidbindung. Die antiparallel verlaufenden β -Faltblätter 1 und 4 bilden zusammen mit α -Helix 4 eine hydrophobe Furche, welche ebenfalls in der Struktur von *hPin1* gefunden wurde [Ranganathan et al., 1997]. Bei dieser Furche handelt es sich im Fall von *hPin1* um die Substratbindungstasche.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Auswahl geeigneter Ligationsstellen

Entsprechend der Zielstellung wurden zunächst geeignete Ligationsstellen für die genannten Proteasen entsprechend ihrer Sekundärspezifität ausgewählt. Die Primärspezifität des jeweiligen Enzyms blieb unberücksichtigt, da aufgrund des Substratmimetika-Konzeptes der Einsatz von Peptidsubstraten mit einer unspezifischen Aminosäure in P1-Position möglich ist (Nomenklatur nach [Schechter und Berger, 1967]). Weiterhin wurde bei der Wahl der Ligationsstelle darauf geachtet, daß der Acylakzeptor (C-terminales Proteinfragment), welcher durch Festphasenpeptidsynthese bereitgestellt werden soll, eine Länge von 50 Aminosäuren nicht übersteigt. Im Hinblick auf die Intein-vermittelte Synthese des Substratmimetikums (N-terminales Proteinfragment) wurde die Ligationsstelle auf die Eignung der C-terminalen Aminosäure überprüft, da diese die *in vivo* als auch *in vitro* Spaltung eines Intein-Fusionsproteins beeinflusst (Tab. 5, [Chong et al., 1998b; Southworth et al., 1999; IMPACTTM-CN, 2004]).

Tab. 5: Effekt der C-terminalen Aminosäure auf die *in vivo* sowie DTT-induzierte *in vitro* Spaltung eines MBP-*Sce* VMA1 Intein-CBD Fusionsproteins (Vektor pTYB1). [IMPACTTM-CN, 2004].

C-terminaler Rest des Proteins	<i>in vivo</i> Spaltung in [%]	<i>in vitro</i> Spaltung mit 40 mM DTT bei	
		4 °C	16 °C
Gly	-	+++	+++
Ala	-	+++	+++
Ile	-	+	+
Leu ¹	-	+	+++
Met ¹	-	+++	+++
Phe ¹	-	+++	+++
Val ¹	-	+	++
Gln ¹	-	+++	+++
Ser	-	++	+++
Trp ¹	-	+++	+++
Tyr ¹	-	+++	+++
Lys ¹	-	+++	+++
Thr ¹	25	++	+++
Glu ¹	50	++	+++
His ¹	50	++	++
Arg ¹	75	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Asp	100	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Asn	-	-	-
Cys	-	-	-
Pro	-	-	-

Spaltung: (-) weniger als 10%; (+) 30-49%; (++) 50-74%; (+++) 75-100%. ¹ Erhitzen im DTT-haltigen Probenpuffer verursacht eine partielle oder vollständige Spaltung des Intein-Fusionsproteins, was zur Überschätzung der *in vivo* Spaltung führt. CBD: Chitin-bindende Domäne, MBP: Maltose-bindendes Protein.

V8-Protease bevorzugt hydrophobe Aminosäuren sowohl im S1'- als auch im S2'-Bindungs-ort, woraufhin die in der α -Helix 4 von Parvulin 10 gelegene Ligationsstelle K63/V64V65 für die Ligationsreaktion ausgewählt wurde (Abb. 17). Die Trypsinvariante D189K/K60E besitzt eine Präferenz für basische Aminosäuren im S1'-Bindungsort. Daraus resultiert die in der α -Helix 3 befindliche Ligationsstelle G43/K44 (Abb. 17).

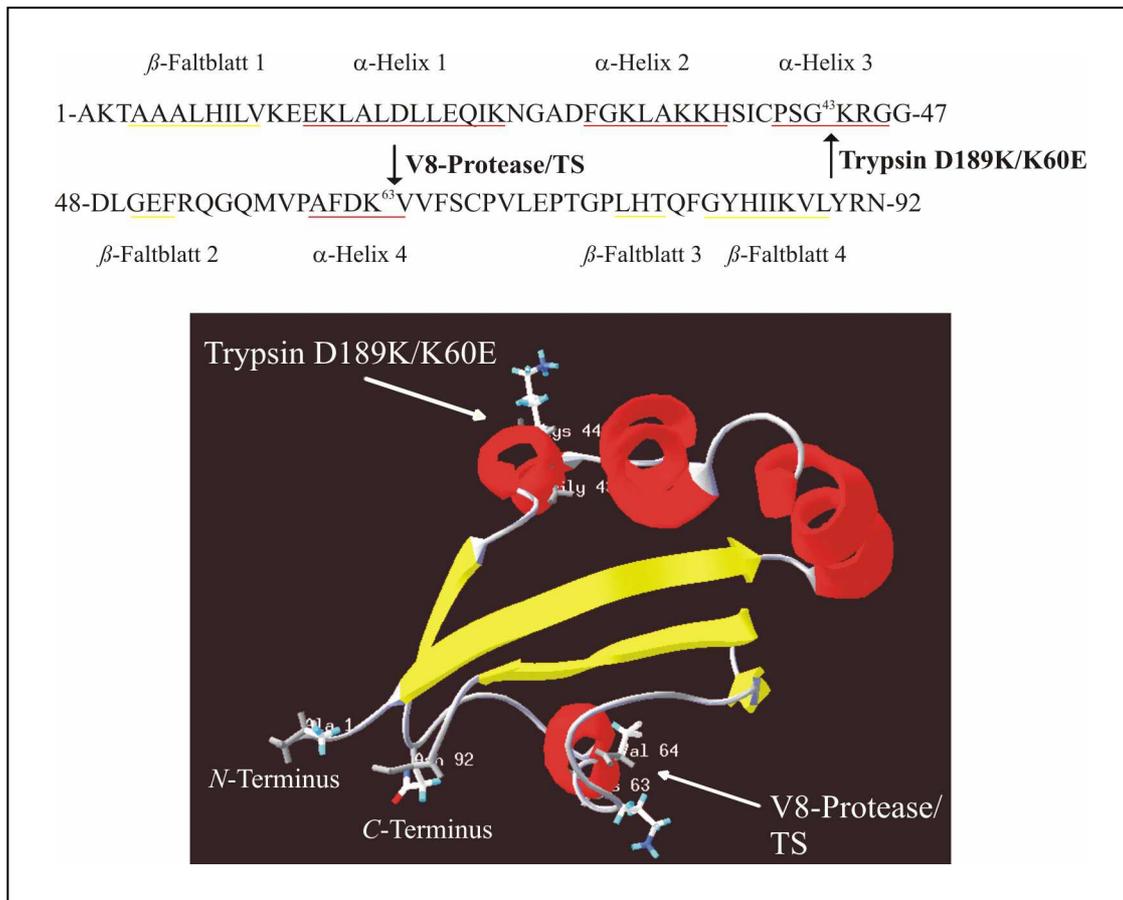


Abb. 17: Sequenz und NMR-Struktur des *E. coli* Par10 [Rahfeld et al., 1994b; Kuhlewein et al., 2004]. Dargestellt sind die ausgewählten Ligationsstellen für die jeweilige potentielle Peptidligase. Das N-terminale Methionin ist nicht dargestellt. TS: Thioglykolsäure, gelb: β -Faltblatt-Bereiche, rot: α -helikale Bereiche. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Swiss-PdbViewer 3.7 (1JNT.pdb).

Demnach bestand die Aufgabe darin, die Parvulinteilsequenzen 1-43 und 1-63 (im Folgenden als Par43 und Par63 bzw. N-terminale Fragmente bezeichnet) als C-terminale Thioester unter Verwendung des IMPACTTM-CN-Systems zu überexprimieren und zu reinigen. Die korrespondierenden Parvulinfragmente 44-92 und 64-92 (im Weiteren mit Par44-92 (C68A) und Par64-92 (C68A) bzw. C-terminale Fragmente bezeichnet) sollten durch SPPS hergestellt werden, wobei sich ein Austausch des Cysteins in Position 68 aufgrund dessen Sensitivität gegenüber Oxidation gegen Alanin empfahl. Dies ist prinzipiell möglich, da die Parvulinvariante C68A eine vergleichbare Aktivität wie der Wildtyp aufweist [Schelbert, 1998].

Weiterhin galt es, in den chemisch synthetisierten Fragmenten eine Fluoreszenzmarkierung vorzunehmen, um selektiv modifiziertes Parvulin zu erzeugen. Zu diesem Zweck sollte der entsprechende rekombinante Thioester (Par43-Thioester für Trypsin D189K/K60E und Par63-Thioester für V8-Protease) als Substratmimetikum fungieren und mit dem jeweiligen C-terminalen Fragment Enzym-katalysiert verknüpft werden.

3.2 Synthese rekombinanter Parvulinfragment-Thioester mittels IMPACT™-CN-System

Zur rekombinanten Synthese C-terminaler Peptid/Protein-Thioester sind verschiedene *E. coli* Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, welche die Klonierung und Expression eines Peptides/Proteins erlauben, das an seinem C-Terminus mit einem Intein-CBD-Tag fusioniert ist (Tab. 6). Dabei kommen modifizierte Inteine aus *Mycobacterium xenopi* (*Mxe* GyrA), *Saccharomyces cerevisiae* (*Sce* VMA1) und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (*Mth* RIR1) zum Einsatz. Zur Darstellung der Parvulinfragment-Thioester wurde der zur Synthese C-terminaler Thioester gut etablierte Vektor pTYB1 ausgewählt.

Tab. 6: Kommerziell erhältliche IMPACT-Vektoren zur Synthese C-terminaler Peptid/Protein-Thioester.

Vektoren	Intein (kDa)	Referenz
pTYB1		Roy et al., 1999; Iakovenko et al., 2000; Macmillan & Bertozzi, 2000
pTYB2	<i>Sce</i> VMA1 Intein (56)	Xu et al., 1999
pTYB3		Perler, 2002
pTYB4		Perler, 2002
pKYB1		Perler, 2002
pTXB1	<i>Mxe</i> GyrA Intein (28)	Sydor et al., 2002
pTXB3		Valiyaveetil et al., 2002
pTWIN1	<i>Mxe</i> GyrA Intein (28)	Evans et al., 1999b
pTWIN2	<i>Mth</i> RIR1 Intein (22)	

Die Klonierung der Parvulinfragmente 1-43 und 1-63 erfolgte dabei entsprechend 5.7 in die *SapI* und *NdeI* Schnittstelle des Vektors (Abb. 18). Dazu wurde der entsprechende DNA-Abschnitt mit überhängenden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *SapI* und *NdeI* durch PCR isoliert. Als Templat diente der pSEP612 Vektor, welcher das Gen des Par10 enthält. Nachdem sowohl der Vektor als auch die gewünschte DNA mit den

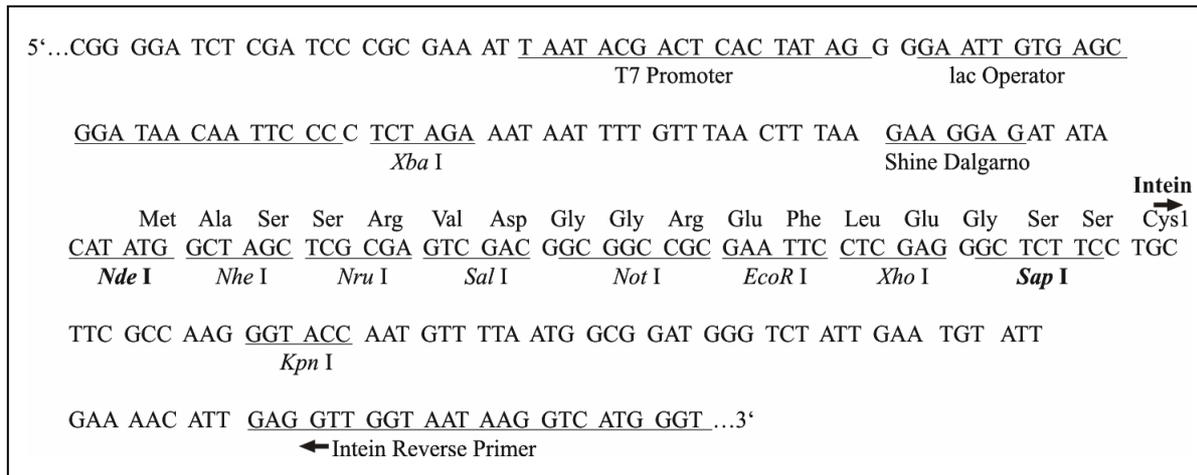


Abb. 18: Polylinker-Region des pTYB1-Vektors.

Restriktionsenzymen geschnitten wurden, erfolgte die Ligation, welche durch DNA-Sequenzierung mit Hilfe des T7 Universal Primers überprüft wurde. Die erhaltenen Klone wurden als pTYB1-Par63 bzw. pTYB1-Par43 und die resultierenden Intein-Fusionsproteine als Par63YB bzw. Par43YB bezeichnet. Die Überexpression eines Intein-Fusionsproteins in *E. coli* steht unter der Kontrolle einer mit IPTG induzierbaren Promoter-Region bestehend aus dem Bakteriophagen T7-Promoter und dem *E. coli* lac-Operator (Abb. 18, [Dubbendorff & Studier, 1991]). Das auf pTYB1 enthaltene lacI Gen, welches den lac Repressor codiert, reprimiert die Proteinexpression vor der Induktion. Die Expression eines Intein-Fusionsproteins erfolgt nach Induktion der Transkription durch die T7-RNA-Polymerase mittels IPTG. Demzufolge stand zunächst der Einfluß von IPTG-Konzentration sowie Induktionstemperatur und -zeit auf die Expression der Intein-Fusionsproteine Par43YB und Par63YB sowie deren Löslichkeit im Mittelpunkt der Untersuchungen (3.2.1 und 3.2.2).

Der nach Zellaufschluß und Zentrifugation erhaltene Rohextrakt wurde zur Beladung einer Chitinsäule verwendet, wobei ausschließlich das Intein-Fusionsprotein aufgrund der Chitinbindenden Domäne spezifisch ans Säulenmaterial bindet, während nicht-gebundene bzw. unspezifisch gebundene Proteine infolge mehrerer Waschschrte entfernt werden (Abb. 19). Zur Separierung des Parvulinfragmentes vom Affinitätsmarker dient die bereits erwähnte Thiol-induzierbare Spaltaktivität am N-Terminus des verwendeten modifizierten Inteins. Das vom Intein-Tag gespaltene Parvulinfragment wird folglich als C-terminaler Thioester von der Säule eluiert.

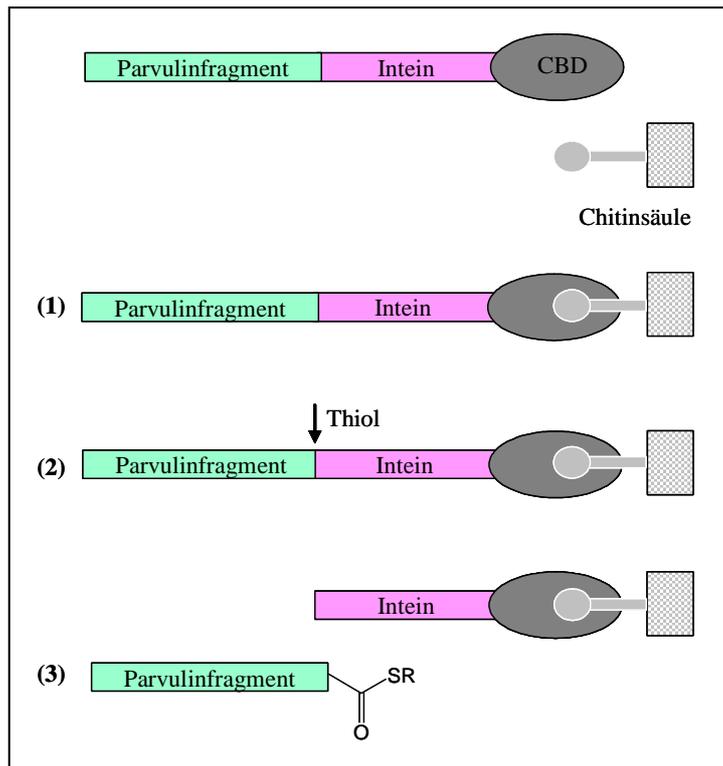


Abb. 19: Schema der Intein-vermittelten Synthese rekombinanter Parvulinfragmente in Form C-terminaler Thioester. (1) spezifische Beladung einer Chitinsäule mit Rohextrakt. (2) Induktion der Intein-vermittelten Spaltung des gebundenen Intein-Fusionsproteins Par63YB bzw. Par43YB durch Zugabe eines Thiois. (3) Elution des freigesetzten Par43- bzw. Par63-Thioesters, wobei gespaltenes Intein-CBD-Tag auf dem Säulenmaterial zurückbleibt.

Die zur Spaltung der Intein-Fusionsproteine verwendeten Thiole wurden einerseits entsprechend ihrer Fähigkeit ausgewählt, direkt eine C-terminale Thioester-Funktion am jeweiligen Parvulinfragment zu erzeugen, die vom entsprechenden Synthesekatalysator erkannt wird. Dieses Auswahlkriterium ist deshalb von enormer Bedeutung, da die Thioester-Funktion solch eines Substratmimetikums die Akzeptanz unspezifischer Peptidsubstrate durch das Enzym vermittelt und somit den Erfolg einer Ligationsreaktion entscheidend mitbestimmt. Andererseits sollten Substratmimetika indirekt über die Bereitstellung eines universellen Ausgangsesters hergestellt werden. Wie für die chemische Synthese von Substratmimetika gezeigt, kann letztgenannter nachfolgend durch Umesterung in das gewünschte Substratmimetikum überführt werden und ermöglicht es auf diese Weise, unterschiedliche Substratmimetika-Typen für verschieden spezifische Proteasen ausgehend von einem Synthesederivat zu erzeugen [Wehofsky et al., 2003]. Dabei unterscheidet man die sequentielle Umesterung, bei der das Substratmimetikum unmittelbar vor Durchführung der Synthesereaktion hergestellt wird, und die parallele Umesterung. Hier erfolgt die Umesterung simultan zur eigentlichen Ligationsreaktion. Generell bietet die parallele Umesterung gegenüber der sequentiellen den Vorteil, daß die Synthese des Substratmimetikums aufgrund

des Substratverbrauches durch das Enzym angetrieben wird. Sowohl die direkte als auch die indirekte chemische Synthese von Substratmimetika wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert [Thormann et al., 1999; Wehofsky & Bordusa, 1999; Wehofsky et al., 2003]. Gegenstand dieser Arbeit war die Nutzung beider Syntheseprinzipien zur Intein-vermittelten Herstellung rekombinanter langkettiger Substratmimetika durch Einsatz verschiedener Thiole. Entsprechend Abb. 20A sollten die etablierten Substratmimetika des Carboxymethylthioester-Typs für V8-Protease sowie des 4-Hydroxyphenylthioester-Typs für Trypsin D189K/K60E [Wehofsky & Bordusa, 1999; Rall, 2004] direkt durch Spaltung des Intein-Fusionsproteins generiert werden. Da ebenfalls für Substratmimetika des Sulfonylethylthioester-Typs eine Akzeptanz durch V8-Protease besteht (unveröffentlichte Ergebnisse, Machova), wurde ebenfalls MESNA in die Studien einbezogen. Während für MESNA und Thioglykolsäure eine Spaltaktivität gegenüber Intein-Fusionsproteinen bereits nachgewiesen werden konnte [Evans et al., 1998; Machova et al., 2003], ist eine solche für 4-Mercaptophenol bislang nicht bekannt.

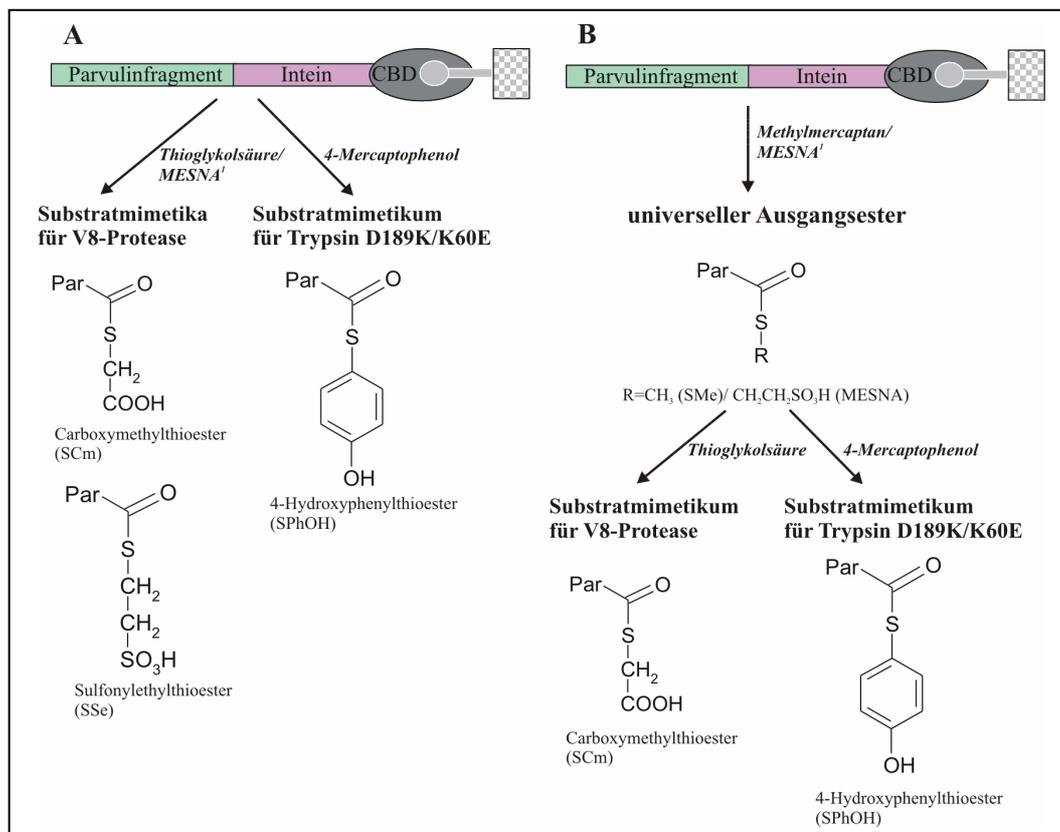


Abb. 20: A) Direkte und B) indirekte Strategien zur Synthese rekombinanter Parvulinfragment-Substratmimetika. ¹ MESNA wurde sowohl zur direkten Erzeugung eines Substratmimetikums für V8-Protease als auch zur Synthese eines universellen Ausgangsesters eingesetzt. Par: jeweiliges Parvulinfragment.

Zur Synthese eines universellen Ausgangsesters entsprechend Abb. 20B sollte Methylmercaptan eingesetzt werden, da Methylthioester aufgrund ihrer flüchtigen Abgangsgruppe bekanntermaßen effizient umestern [Wehofsky et al., 2003]. Allerdings wurde dieses Thiol bislang nicht zur Spaltung von Intein-Fusionsproteinen eingesetzt, weshalb von einer durch Methylmercaptan induzierten Spaltungsreaktion eines Intein-Fusionsproteins nicht ausgegangen werden konnte. Aufgrund der bekannten hohen Spalteffizienz von MESNA in EPL-Reaktionen und der geringen Hydrolyseanfälligkeit des resultierenden Thioesters wurde dieses Thiol in die Untersuchungen einbezogen [Evans et al., 1998; Ayers et al., 1999]. Jedoch ist vom resultierenden Sulfonylethylthioester konträr zum Methylthioester nicht bekannt, ob sich dieser als universeller Ausgangsester eignet. Somit sollte wechselseitig untersucht werden, ob sich einerseits der für die *in situ* Generierung von Substratmimetika etablierte Methylthioester durch Intein-vermittelte Synthese darstellen läßt, und sich andererseits der bekanntermaßen mittels Intein-Strategie herstellbare Sulfonylethylthioester als universeller Ausgangsester eignet.

Demzufolge galt es im speziellen, die Substratmimetika Par63-SCm und Par63-SSe für V8-Protease sowie das Substratmimetikum Par43-SPhOH für Trypsin D189K/K60 direkt durch Spaltung des entsprechenden Intein-Fusionsproteins mittels Thioglykolsäure, MESNA bzw. 4-Mercaptophenol herzustellen (Abb. 20A). Das letztgenannte Thiol sollte dabei hinsichtlich seiner Spaltaktivität untersucht werden, da dieses bislang nicht für Intein-vermittelte Spaltungsreaktionen eingesetzt wurde. In analoger Weise war die Fähigkeit von Methylmercaptan zur Spaltung von Par63YB und damit zur Synthese des universellen Ausgangsesters Par63-SMe Gegenstand der Untersuchungen (Abb. 20B), um diesen nachfolgend für die *in situ* Generierung eines Substratmimetikums für V8-Protease einzusetzen. Ferner bestand die Aufgabe darin, den Parvulinfragment-Thioester Par43-SSe herzustellen, um zu überprüfen, ob sich auch dieser als universeller Ausgangsester zur indirekten Synthese von Substratmimetika eignet (Abb. 20B).

3.2.1 Synthese der Par63-Thioester

Nach Transformation des Plasmids pTYB1-Par63 in kompetente BL21(DE3)-Zellen entsprechend 5.5 erfolgte die Expression des Intein-Fusionsproteins, wobei es zunächst den Einfluß von IPTG-Konzentration, Induktionstemperatur und -zeit auf die Expression zu untersuchen galt. Dazu wurde die Proteinexpression mit 0,1-1,0 mM IPTG induziert und über 8 Stunden bei 25, 30 und 37 °C durch Analyse mittels SDS-PAGE verfolgt (5.2). In allen Fällen erfolgte eine Überexpression des Intein-Fusionsproteins, wobei diese bei 30 und 37 °C

nach 4 Stunden am höchsten war. Der Einsatz unterschiedlicher IPTG-Konzentrationen hatte hingegen keinen Einfluß auf die Expressionsrate. Da jedoch das bei 25, 30 und 37 °C exprimierte Intein-Fusionsprotein größtenteils unlöslich war, erfolgte dessen weitere Expression bei 16 °C für 16 Stunden. Durch Herabsetzen der Induktionstemperatur konnte die Löslichkeit des Intein-Fusionsproteins entscheidend verbessert werden, da bekanntermaßen dessen korrekte Faltung und damit Löslichkeit aufgrund einer verminderten Geschwindigkeit der Proteinsynthese begünstigt wird [Schein, 1990; Chong et al., 1998b; Southworth et al., 1999].

Im weiteren Verlauf erfolgte die Intein-vermittelte Darstellung der Substratmimetika Par63-SCm, -SSe sowie des universellen Ausgangsesters Par63-SMe zunächst nach einem vom Hersteller vorgeschlagenen Syntheseprotokoll bei pH 6,5. Zu diesem Zweck wurden Spaltreaktionen mit 100 mM Thiol (Thioglykolsäure, MESNA oder Methylmercaptan) für 16 Stunden bei 4 °C durchgeführt. Aufgrund eines vorhandenen Cysteinrestes im Par63-Fragment wurde eine mögliche Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen durch Zugabe von TCEP während der Synthese unterdrückt [Burns et al., 1991]. TCEP reduziert Disulfidbrückenbindungen, ohne die Intein-vermittelte Spaltung zu beeinflussen. Zur Detektion des jeweiligen Parvulinfragment-Thioesters wurden die Elutions-Fractionen und auf dem Säulenmaterial befindliche Proteine (Säulen-Fraktion) mittels Western-Blot unter Einsatz eines Anti-Par10-Antikörpers analysiert. Dem SDS-Probenpuffer wurde TCEP anstelle der Reduktionsmittel DTT oder β -Mercaptoethanol zugesetzt, da die beiden letztgenannten zur partiellen oder vollständigen Spaltung eines Intein-Fusionsproteins in Abhängigkeit von der C-terminalen Aminosäure führen können. Für die Aminosäure Lysin, wie sie C-terminal im Par63-Fragment vorhanden ist, wird eine solche Sensitivität gegenüber DTT oder β -Mercaptoethanol am Beispiel des MBP-*Sce* VMA Intein-Fusionsproteins beschrieben (vgl. Tab. 5, [IMPACTTM-CN, 2004]).

Die Auswertung der Western-Blot-Analysen ergab allerdings, daß der entsprechende Thioester in keiner der Elutions-Fractionen enthalten war, obwohl durch Thiolzugabe in jedem Fall die Spaltung des Intein-Fusionsproteins erfolgte, wie die Analyse der Säulen-Fraktion zeigte. Durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 1 M NaCl und die Zugabe des nichtionischen Detergenz Triton X-100 in einem Volumenanteil von 0,1% wurde die Löslichkeit des jeweiligen Proteinfragment-Thioesters erhöht, so daß dieser von der Säule eluiert wurde (Abb. 21). Allerdings blieb ein Teil des Thioesters sowie ungespaltenes Intein-Fusionsprotein auf dem Säulenmaterial zurück (Abb. 21, Bahn 19). Da die Elution der

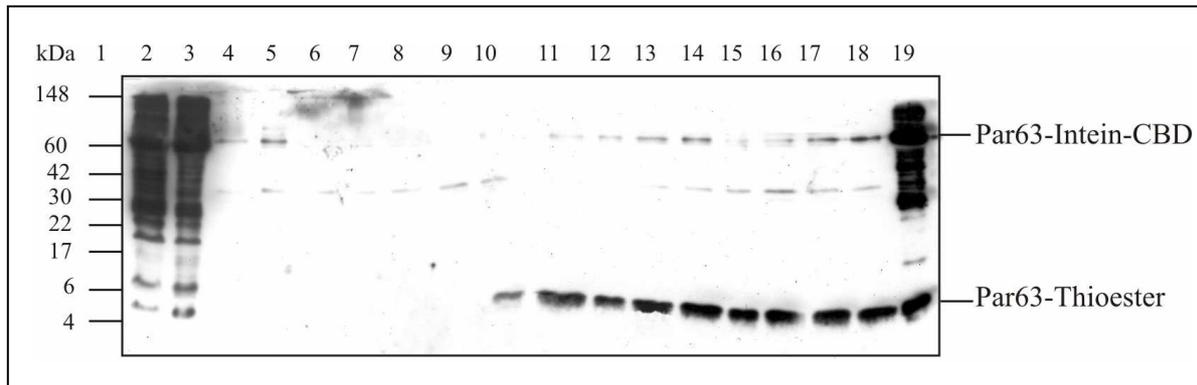


Abb. 21: Western-Blot-Analyse der Intein-vermittelten Synthese des Substratmimetikums Par63-SCm. **Bahn 1:** MultiMark Molekulare-Masse-Standard, **Bahn 2:** Zellaufschluß *E.coli* BL21 [pTYB1-Par63], **Bahn 3:** Rohextrakt nach Zentrifugation, **Bahn 4:** Säulen-Durchlauf, **Bahn 5, 6:** Wasch-Fractionen, **Bahn 7-18:** Elutions-Fractionen 1-12, **Bahn 19:** Säulen-Fraktion.

Proteinfragment-Thioester auch unter diesen Bedingungen nicht vollständig erfolgte, wurde Harnstoff verwendet, um eine bessere Löslichkeit zu erzielen. Der Einsatz des Denaturants in einer Konzentration von 2 M führte zur vollständigen Elution der Parvulinfragment-Thioester. Die Elutions-Fractionen wurden mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert, wobei die ermittelten molekularen Massen von 6864 Da für Par63-SCm, 6820 Da für Par63-SMe und 6914 Da für Par63-SSe den berechneten Werten entsprechen (Tab. 8). Somit konnte neben der bekannten Spaltaktivität von MESNA und Thioglykolsäure gegenüber Intein-Fusionsproteinen eine ebensolche auch für Methylmercaptan nachgewiesen werden. Das *N*-terminale Methionin unterlag prinzipiell einer posttranslationalen Abspaltung. In den Massenspektren aller synthetisierten Thioester fiel zudem ein Peak auf, welcher eine um das jeweils verwendete Thiol geringere molekulare Masse als der entsprechende Thioester aufweist. Als Ursache für dieses Phänomen wird eine intramolekulare Kondensationsreaktion des jeweiligen Par63-Thioesters vermutet (3.3.3). Weiterhin wurden die Hydrolyseprodukte der Thioester massenspektrometrisch nachgewiesen. Im Falle des Par63-SCm traten zudem Nebenprodukte auf, die auf Polymerisierungen durch Thioglykolsäure zurückzuführen sind. Ursache dafür ist ein nukleophiler Angriff der Sulfhydryl-Funktion von Thioglykolsäure auf das Carbonylkohlenstoffatom der Carboxylatgruppe des Par63-Carboxymethylthioesters. Solche Polymerisierungen, die reversibel verlaufen, traten auch bei der chemischen Synthese von Aminosäure-Carboxymethylthioestern auf (unveröffentlichte Ergebnisse, Wehofsky).

Nachdem anhand dieser Ergebnisse einerseits die generelle Eignung der Intein-Strategie zur Darstellung rekombinanter Parvulinfragment-Substratmimetika (Par63-SCm, -SSe) und andererseits erstmalig die erfolgreiche Synthese eines langkettigen rekombinant hergestellten universellen Ausgangsesters (Par63-SMe) gezeigt werden konnte, erfolgte im weiteren Verlauf deren präparative Darstellung. Dabei kam ein optimiertes Syntheseprotokoll zum

Einsatz, welches folgende Charakteristika aufweist. Zur Erhöhung der Effizienz der induzierbaren Spaltaktivität des modifizierten Inteins (vgl. Abb. 21) wurde der pH-Wert während der Reinigung von 6,5 auf 7,0 und die Thiolkonzentration von 100 auf 200 mM erhöht [IMPACTTM-CN, 2004]. Weiterhin erfolgte die Spaltreaktion für 48 Stunden bei 4 °C. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde die Chitinsäule nach der Beladung mit Rohextrakt von *E. coli* BL21 [pTYB1-Par63] mit einem Puffer gewaschen, der 1 M NaCl enthielt. Zur Erhöhung der Löslichkeit des nach Thiol-induzierter Spaltung des Intein-Fusionsproteins erzeugten Parvulinfragment-Thioesters wurde dem Elutionspuffer in allen Fällen 2 M Harnstoff zugesetzt. TCEP wurde zur Reduktion einer möglichen Disulfidbrückenbindung während der Synthese zugegeben. Ebenfalls wurde dieses dem SDS-Probenpuffer zugesetzt. Durch Anwendung des optimierten Syntheseprotokolls konnten die Parvulinfragment-Thioester Par63-SCm, -SSe und -SMe in hoher Reinheit erhalten werden, wobei die Ausbeuten zwischen 2 und 3 mg pro Liter Bakterienkultur betragen. In Abb. 22 ist die SDS-PAGE der Synthese von Par63-SCm beispielhaft dargestellt. Alle eingesetzten Thiole führten unter den optimierten Bedingungen zur nahezu vollständigen Spaltung des Intein-Fusionsproteins (Tab. 8). Die Spalteffizienzen wurden densitometrisch mit dem Programm AIDA bestimmt und betragen 95%.

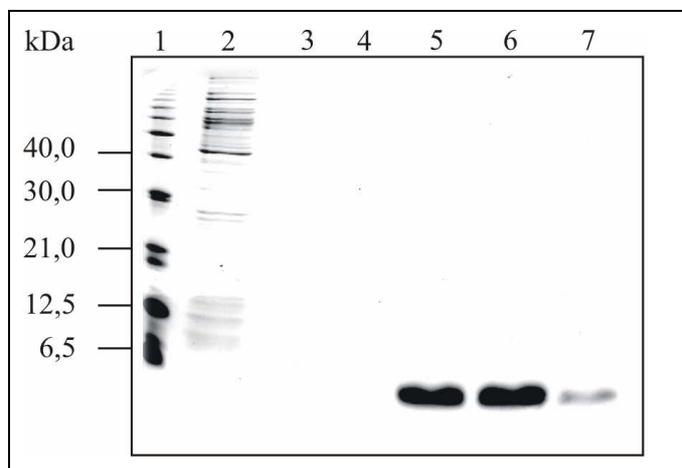


Abb. 22: SDS-PAGE der Synthese des Substratmimetikums Par63-SCm. Bahn 1: 10 kDa und Test 5 Molekulare-Masse-Standards, **Bahn 2-4:** Wasch-Fractionen, **Bahn 5-7:** Elutions-Fractionen 1-3. (15% Acrylamid, Coomassiefärbung).

Nach seiner erfolgreichen Darstellung wurde der synthetisierte langkettige universelle Ausgangsester Par63-SMe zur indirekten Synthese des Substratmimetikums Par63-SCm eingesetzt. Zu diesem Zweck erfolgte eine sequentielle Umesterung des exprimierten Parvulinfragment-Thioesters mit Thioglykolsäure, wobei im Hinblick auf die Totalsynthese von Parvulin Thioglykolsäure in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt wurde (vgl.

Tab. 7: Mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestimmte molekulare Massen der Par63-Thioester, welche durch Thiol-induzierte Spaltung des Par63YB Intein-Fusionsproteins synthetisiert wurden und Spalteeffizienz der verwendeten Thiole.

Thiol (molekulare Masse)	m/z (berechnet)	m/z (bestimmt)	Spalteeffizienz in [%]	
HS—CH ₂ —CH ₂ —SO ₃ H MESNA (142,105)	6914	6914	95	weiteres Produkt 6772 (MD: 142)
HS—CH ₂ —COOH Thioglykolsäure (92,11)	6864	6864	95	weiteres Produkt 6772 (MD: 92)
HS—CH ₃ Methylmercaptan (48,102)	6820	6820	95	weitere Produkt 6772 (MD:48)

MD: Massedifferenz zum jeweiligen Thioester

3.3.1). Entsprechend Abb. 23 konnte das gebildete Substratmimetikum mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden (m/z (berechnet): 6864; m/z (bestimmt): 6864). Hingegen wurde der Ausgangsester nicht detektiert, was einen vollständigen Umsatz von Par63-SMe direkt nach Thiolzugabe anzeigt. Auf der Grundlage dieser Experimente konnte erstmals demonstriert werden, daß rekombinante langkettige Methylthioester mittels Umesterung in Substratmimetika überführbar sind und sich diese Strategie nicht nur auf kürzere Peptid-Thioester, wie kürzlich in einer Studie unseres Arbeitskreises gezeigt werden konnte, beschränkt [Wehofsky et al., 2003]. Wie bei der Intein-vermittelten Synthese der Parvulinfragment-Thioester entstand bei der Umesterung ein weiteres Produkt, welches ein um das Thiol geringeres Molekulargewicht als der Thioester aufweist (Abb. 23, c). In analoger Weise wird eine zugrundeliegende intramolekulare Kondensationsreaktion diskutiert (3.3.3). Da bisher ein Einfluß dieser Nebenreaktion, welche zur Bildung des Kondensationsproduktes führt, auf V8-Protease-katalysierte Ligationsreaktionen nicht feststellbar war (vgl. 3.3.1), folgten an dieser Stelle keine weiteren Untersuchungen zur Stabilität der Par63-Thioester. Ebenfalls wurde das Hydrolyseprodukt des Thioesters massenspektrometrisch detektiert.

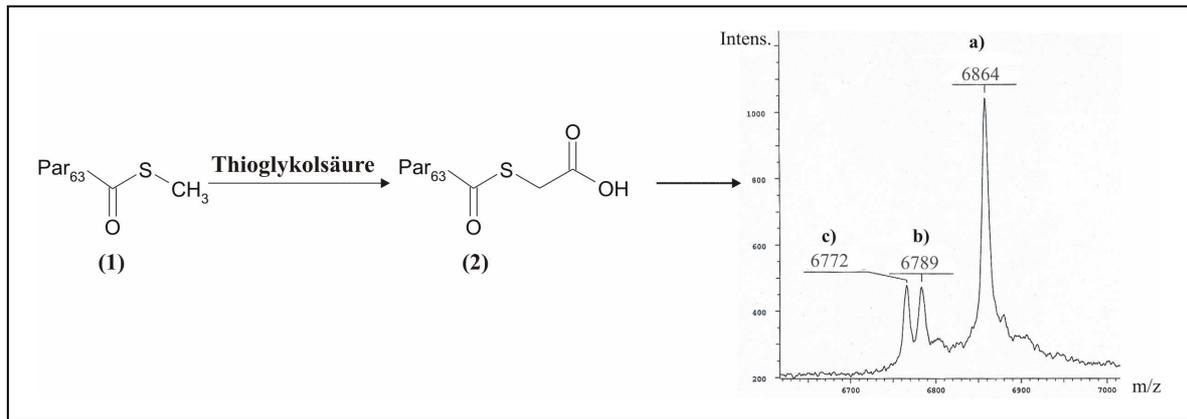


Abb. 23: Bildung des Substratmimetikums Par63-SCm durch Umesterung des rekombinanten Ausgangsesters Par63-SMe. (1) Struktur des Par63-Methylthioesters (Par63-SMe), (2) Struktur des Par63-Carboxymethylthioesters (Par63-SCm), a) Par63-SCm, m/z (berechnet): 6864, m/z (bestimmt): 6864, b) Par63-OH, m/z (berechnet): 6789, m/z (bestimmt): 6789, c) weiteres Produkt, m/z (bestimmt): 6772. [Par63-SMe] = 0,1 mM, [Thioglykolsäure] = 100 mM, 50 mM Natriumphosphat, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 7,0.

3.2.2 Synthese der Par43-Thioester

Zur Synthese der Parvulinfragment-Thioester Par43-SPhOH und Par43-SSe wurden die Thiole 4-Mercaptophenol bzw. MESNA eingesetzt. Da für die Par63-Thioester unter Verwendung des pTYB1-Vektors die Synthesausbeuten lediglich 2-3 mg pro Liter Bakterienkultur betragen, sollte im Folgenden im Hinblick auf das Ziel dieser Arbeit anhand der Synthese des Par43-SSe versucht werden, eine Steigerung der Ausbeute zu bewirken. Die Expressionsrate von Intein-Fusionsproteinen kann vom verwendeten Intein abhängig sein [IMPACTTM-CN, 2004], weshalb ein weiterer Vektor, pTXB1, welcher das *Mxe* GyrA Intein aus *Mycobacterium xenopi* enthält, in die Untersuchungen einbezogen wurde. Die Klonierung des Intein-Fusionsproteins Par43XB erfolgte dabei in analoger Weise zum Par43YB, da beide Vektoren über identische Klonierungsstellen verfügen. Das hergestellte Konstrukt erhielt die Bezeichnung pTXB1-Par43 und das resultierende Intein-Fusionsprotein Par43XB (Par43-*Mxe* GyrA intein-CBD). Zunächst erfolgte die Expression der Intein-Fusionsproteine Par43YB und Par43XB unter verschiedenen Bedingungen analog 3.2.1. Die effizienteste Expression beider Intein-Fusionsproteine wurde wie für Par63YB nach 4 Stunden bei 30 und 37 °C erreicht. Zur Erhöhung der Löslichkeit der Intein-Fusionsproteine erfolgte die Expression ebenfalls für 16 Stunden bei 16 °C. In analoger Weise hatten verschiedene IPTG-Konzentrationen keinen signifikanten Einfluß auf die Proteinexpression. Unterschiede ergaben sich jedoch in Abhängigkeit des verwendeten Inteins. Es wurde eine höhere Expressionsrate bei Verwendung des *Mxe* GyrA Inteins im Vergleich zum *Sce* VMA Intein erzielt.

Die sich anschließende Synthese des Par43-SSe erfolgte entsprechend 3.2.1. Ausgehend von Par43YB konnte der nach Spaltung mit MESNA resultierende Par43-Thioester in gereinigter Form in einer Ausbeute von 2 mg pro Liter Bakterienkultur synthetisiert werden. Das aufgenommene Massenspektrum zeigte neben dem Peak für den Parvulinfragment-Thioester ebenfalls einen Peak mit einer Massedifferenz von 142. Wie bei den Par63-Thioestern wird auch hier eine intramolekulare Kondensationsreaktion während der Proteinreinigung bzw. -synthese als Ursache für die Massedifferenz diskutiert (3.3.3). Im Gegensatz zur Synthese des Par43-SSe, welcher durch Spaltung von Par43YB hergestellt wurde, wiesen die Protein-haltigen Elutions-Fraktionen, die nach Spaltung von Par43XB mit MESNA erhalten wurden, zusätzliche Verunreinigungen auf (Abb. 24). Vermutlich handelt es sich hierbei um co-eluiertes Intein-Tag. Es konnte für die MESNA-induzierte Spaltung beider Intein-Fusionsproteine eine Effizienz von 95% erzielt werden.

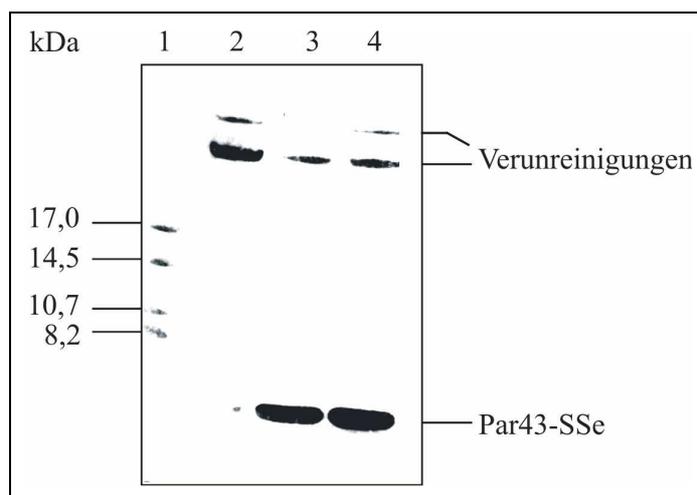


Abb. 24: Tricin-SDS-PAGE der Synthese von Par43-SSe. Bahn 1: MW klein Molekulare-Masse-Standard, **Bahn 2-4:** Elutions-Fraktionen 1-3. (16,5%, Schnell-silberfärbemethode).

Aufgrund des signifikanten Ausbeute-reduzierenden Einflusses der Kondensationsreaktionen der Par43-Thioester in initialen Modellreaktionen (vgl. 3.3.2) erfolgte die weitere Reinigung des Par43-SSe mit gleichzeitiger Unterdrückung der Kondensationsreaktionen unter sauren Bedingungen mittels Perfusionschromatographie. Die massenspektrometrisch detektierten Kondensationsprodukte sind auf intramolekulare Reaktionen und damit auf einen Angriff nukleophiler Seitenketten auf das Carbonyl-C-Atom der Thioester-Funktion zurückzuführen (vgl. 3.3.3). Durch Herabsetzen des pH-Wertes sollten potentielle Nukleophile protoniert und somit temporär blockiert werden. Mit dieser optimierten Strategie konnte Par43-SSe bis zur Homogenität in einer Ausbeute von 6 mg pro Liter Bakterienkultur gereinigt werden. Im MALDI-ToF-Massenspektrum wurde der gewünschte Par43-Thioester nachgewiesen (Abb. 25B).

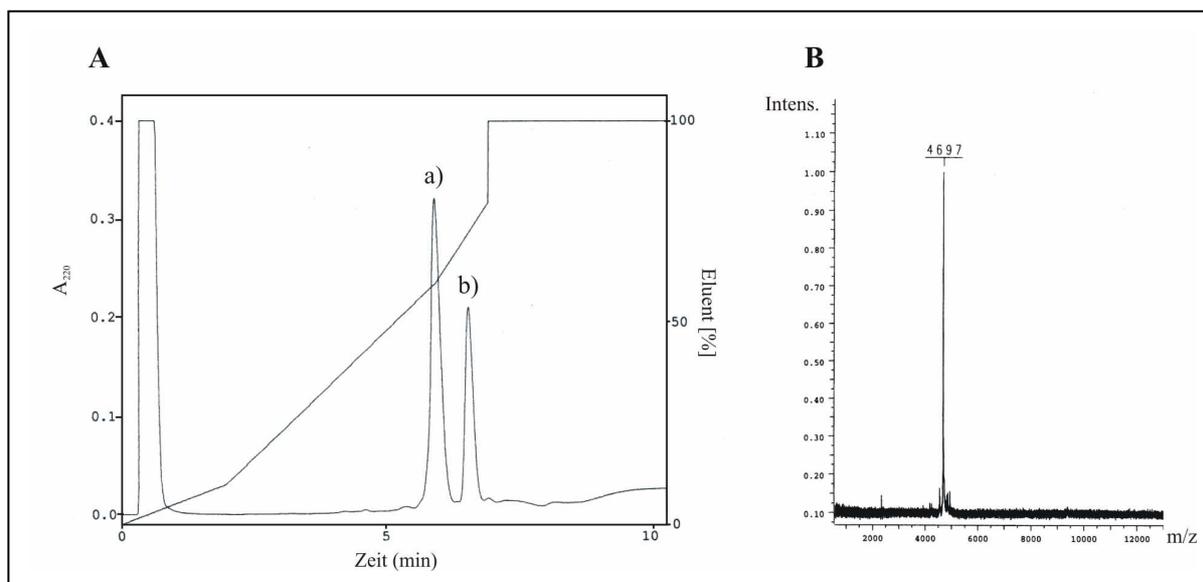


Abb. 25: Elutionsprofil der Reinigung von Par43-SSe mittels Perfusionschromatographie unter sauren Bedingungen (A) und MALDI-ToF-Massenspektrum des gereinigten Par43-SSe (B). a) Par43-SSe, b) Verunreinigungen, m/z (berechnet): 4695, m/z (bestimmt): 4697.

Es kann demnach zusammengefaßt werden, daß durch Einsatz des *Mxe* GyrA Inteins zur Synthese von Par43-SSe ein Ausbeute-steigernder Effekt gegenüber dem verwendeten *Sce* VMA Intein aus Hefe resultiert. Obwohl es im erstgenannten Fall eines zusätzlichen Reinigungsschrittes bedarf, konnte die Ausbeute an Par43-SSe um den Faktor 3 erhöht werden. Desweiteren wurde festgestellt, daß MESNA beide Intein-Fusionsproteine unter den gewählten Bedingungen sehr effizient spaltet, womit für die Spaltaktivität des Thiols keine Abhängigkeit vom verwendeten Intein hervorgeht. Durch Anwendung des optimierten Reinigungsprotokolls unter sauren Bedingungen konnte die Bildung von Kondensationsprodukten erfolgreich unterdrückt werden.

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob der synthetisierte Parvulinfragment-Thioester Par43-SSe tatsächlich als universeller Ausgangsester zur *in situ* Generierung von Substratmimetika dienen kann. Zu diesem Zweck erfolgte eine Umesterungsreaktion durch Zugabe von 4-Mercaptophenol. Wie aus Abb. 26 ersichtlich ist, wurde Par43-SSe zum Substratmimetikum Par43-SPhOH umgesetzt, wodurch der MESNA-Ester erstmals als universeller Ausgangsester identifiziert werden konnte. Analog 3.2.1 wurde im MALDI-ToF-Massenspektrum ein Peak mit einer Massedifferenz von 142 zum Par43-SSe detektiert (Abb. 26, Peak b). Hierfür wird ebenfalls eine intramolekulare Kondensationsreaktion des Par43-Thioesters diskutiert (3.3.3). Um auszuschließen, daß die bei der Umesterung beobachtete Kondensationsreaktion von der Sulfonylethylthioester-Funktion abhängig ist, wurde ebenfalls der universelle Ausgangsester Par43-SMe in die Studien einbezogen. Dessen Synthese und

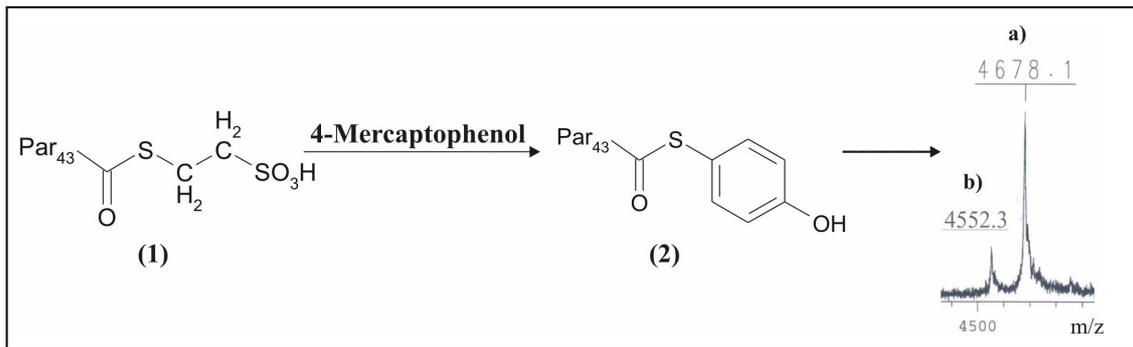


Abb. 26: Bildung des Substratmimetikums Par43-SPhOH durch Umesterung des rekombinanten Ausgangsesters Par43-SSe. (1) Struktur des Par43-Sulfonylethylthioesters (Par43-SSe), (2) Struktur des Par43-Hydroxyphenylthioesters (Par43-SPhOH), a) Par43-SPhOH, m/z (berechnet): 4679, m/z (bestimmt): 4678, b) weiteres Produkt, m/z (bestimmt): 4552. [Par43-SSe]= 0,1 mM, [4-Mercaptophenol] = 4 mM, 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 7,0.

Reinigung erfolgte analog der von Par43-SSe, wobei das Par43XB Intein-Fusionsprotein aufgrund höherer Expressionsraten für die Spaltreaktion mit Methylmercaptan eingesetzt wurde. Der gereinigte Par43-SMe konnte in einer Ausbeute von 6 mg pro Liter Bakterienkultur erhalten und mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden (m/z (berechnet): 4601, m/z (bestimmt): 4601). Da das Nebenprodukt ebenfalls bei der Umesterung des Ausgangsesters Par43-SMe mit 4-Mercaptophenol gebildet wurde, konnte eine Abhängigkeit der intramolekularen Kondensationsreaktion während der Umesterungsreaktion von der verwendeten Ester-Funktion ausgeschlossen werden.

Zur direkten Synthese des Substratmimetikums Par43-SPhOH wurde aufgrund einer höheren Ausbeute an Par43-SSe, die durch Verwendung des *Mxe* GyrA Inteins resultiert, ebenfalls das Intein-Fusionsprotein Par43XB zur Spaltung mit 4-Mercaptophenol eingesetzt. Die Darstellung erfolgte nach dem optimierten Synthese- und Reinigungsprotokoll mit folgenden Abweichungen. 4-Mercaptophenol wurde im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Thiolen in einer Konzentration von nur 10 mM zur Spaltreaktion eingesetzt. Ursachen dafür waren, daß eine Spalteffizienz von 50% auch durch Zugabe höherer Konzentrationen an 4-Mercaptophenol nicht signifikant gesteigert werden konnte. Desweiteren führte eine hohe Konzentration von 4-Mercaptophenol aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit dieses Thiols zur erschwerten Elution des Proteinfragment-Thioesters vom Säulenmaterial, zur partiellen Präzipitation des Thioesters sowie zur schwierigen Abtrennung des Thiols. Analog der Synthese von Par43-SSe, ausgehend vom Intein-Fusionsprotein Par43XB, wurden in den Elutions-Fractionen von Par43-SPhOH ebenfalls höhermolekulare Verunreinigungen detektiert, die vermutlich coeluiertes Intein-Tag darstellen. Ebenfalls wurde ein intramolekulares Kondensationsprodukt massenspektrometrisch nachgewiesen. Die Abtrennung dieser Proteine als auch des überschüssigen Thiols erfolgte wie für Par43-SSe beschrieben

unter sauren Bedingungen mittels Perfusionschromatographie. Da das Dimer von 4-Mercaptophenol eine identische Hydrophobizität wie der gewünschte Parvulinfragment-Thioester besitzt, konnten unter den verwendeten Bedingungen beide Verbindungen nicht chromatographisch aufgelöst werden. Aus diesem Grund wurde während der gesamten Synthese von Par43-SPhOH das Reduktionsmittel TCEP in einer Konzentration von 15 mM zugesetzt, um das Thiol im monomeren Zustand zu halten. Unter diesen Bedingungen konnte der gewünschte Parvulinfragment-Thioester vom Thiol sowie den Verunreinigungen abgetrennt werden. Eine massenspektrometrische Analyse des gereinigten Proteinfragment-Thioesters zeigte den gewünschten Peak für Par43-SPhOH (m/z (berechnet): 4679; m/z (bestimmt): 4680). Allerdings konnte lediglich 1 mg des Parvulinfragment-Thioesters pro Liter Bakterienkultur gereinigt werden. Dafür verantwortlich sollte neben der bereits erwähnten geringeren Spalteffizienz von 4-Mercaptophenol ebenfalls eine gegenüber Par43-SSe vermutete stärkere Bildung von Kondensationsprodukten aufgrund einer höheren Reaktivität der SPhOH-Gruppe gegenüber der Sulfonylethylthioester-Funktion sein (3.3.3).

3.3 Initiale Modellreaktionen

3.3.1 V8-Protease-katalysierte Ligationsreaktionen

Generelle Voraussetzung für die erfolgreiche V8-Protease-katalysierte Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10 (C68A) ist die Akzeptanz der langkettigen Ausgangsstoffe durch das Enzym (Abb. 27). Demzufolge bestand die Aufgabe zunächst darin, die generelle Eignung des Substratmimetikums sowie der Acylakzeptorkomponente in getrennten enzymkatalysierten Modellreaktionen zu untersuchen. Das Substratmimetikum wurde aufgrund der Universalität der *in situ* Umesterungsmethode indirekt über einen Ausgangsester hergestellt, wobei die Umesterung in paralleler Reaktionsführung erfolgte.

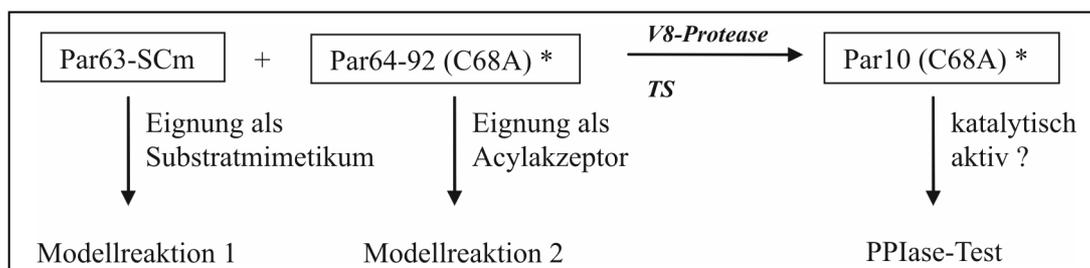


Abb. 27: Modellreaktionen im Hinblick auf die Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10 (C68A) mittels V8-Protease. Der Stern kennzeichnet einen Fluoreszenzmarker.

Zur Herstellung einer funktionsrelevanten fluoreszenzmarkierten Parvulinspezies wurde der Glutaminrest 80 zur Modifizierung ausgewählt, da er sich am Rand der putativen Substratbindungstasche von Parvulin 10 befindet (vgl. Kapitel 1, Abb. 1). Die Fluoreszenzmarkierung des Parvulinfragmentes Par64-92 (C68A) wurde durch kovalente Verknüpfung eines Dansylrestes (Dns) über einen Ethylenamin-Linker an die Seitenkette des Gln80-Restes realisiert (Abb. 28). Der dansylierte Glutaminrest Gln(Dns) erhielt die Bezeichnung B.

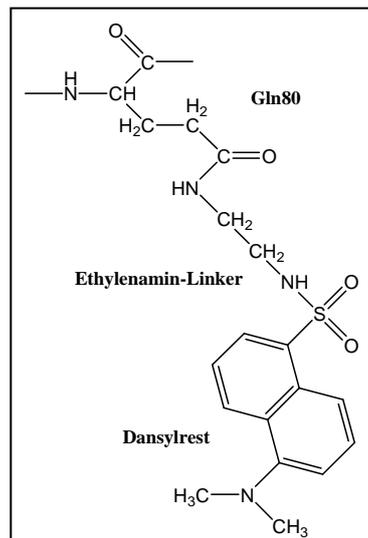


Abb. 28: Verknüpfung von Gln80 mit einem Dansylrest über einen Ethylenamin-Linker.

Der Einsatz von V8-Protease in Peptid- bzw. Proteinsynthesereaktionen mit Asp- und Glu-haltigen Substraten bedarf der Unterdrückung der proteolytischen Aktivität des Enzyms gegenüber den sensitiven Aminosäureresten. Das Parvulinfragment 1-63 enthält insgesamt 8 potentielle Spaltstellen für V8-Protease, 4 Glu- und 4 Asp-Reste (Abb. 29). Durch Inkubation des Enzyms mit einem Überschuß an Thioglykolsäure werden ursprünglich spezifische Glu- und Asp-Xaa-Bindungen nicht gespalten [Wehofsky, 2000]. Gleichzeitig dient dieses Thiol als Umesterungsreagenz zur Erzeugung des Substratmimetikums Par63-SCm ausgehend vom Vorläufermolekül Par63-SMe (parallele Umesterung).

¹AKTAAALHILVK **E¹³E¹⁴**KLALD¹⁹**LLE²²**QIKNGAD²⁹FGKLAKKHSICPSGKRGD⁴⁸**LGE⁵¹**FRQQQMV
PAFD⁶²K⁶³

Abb. 29: Sequenz des Par63-Fragmentes. Rot hervorgehoben sind potentielle Spaltstellen für V8-Protease.

Zur Untersuchung der generellen Akzeptanz des langkettigen Substratmimetikums Par63-SCm durch das Enzym entsprechend Abb. 27 wurden Modellreaktionen mit dem Peptid VVFSAP (Anfangssequenz von Par64-92 (C68A/Q80B) in 50 mM Natriumphosphat, 1 mM

TCEP, bei pH 8,0 durchgeführt. Die Konzentration des Thioestersubstrates und des Enzyms betrug 0,1 mM bzw. 14-50 nM und die Konzentration des nukleophilen Peptides 0,3-0,5 mM. Thioglykolsäure wurde in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Zur Erhöhung der Löslichkeit der Parvulinfragment-Thioester wurde 2 M Harnstoff zugegeben, wobei in Voruntersuchungen die Aktivität der V8-Protease in 2 M Harnstoff bestätigt werden konnte (Abb. 30).

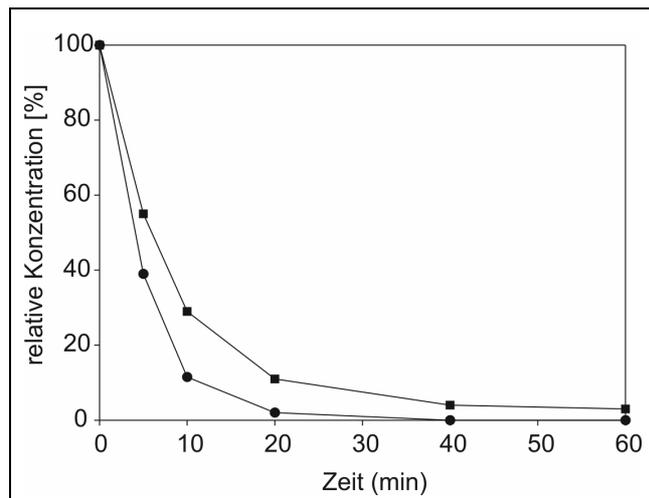


Abb. 30: V8-Protease-katalysierte Hydrolyse von Z-Glu-OMe ohne ● und in Gegenwart von 2 M Harnstoff ■. [Z-Glu-OMe] = 3 mM, [V8-Protease] = $4,6 \times 10^{-8}$ M, 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, 37 °C.

Das Substratmimetika-Vorläufermolekül Par63-SMe wurde aufgrund der Zugabe der hohen Konzentration an Thioglykolsäure praktisch sofort zum Substratmimetikum Par63-SCm umgesetzt (< 1 min). Allerdings kam es simultan zu dessen proteolytischen Abbau, so daß es als Acyldonorkomponente zur Knüpfung auf das Modellpeptid nicht zur Verfügung stand. Als Resultat konnte das gewünschte Syntheseprodukt nicht erhalten werden. Eine massenspektrometrische Analyse der Spaltprodukte ergab, daß diese nicht auf Spaltung durch V8-Protease zurückzuführen waren, sondern auf proteolytische Fremdaktivität. Dies überraschte insofern, als daß bislang alle eingesetzten Chargen der V8-Protease keine proteolytische Fremdaktivität aufwiesen, was auch den Einsatz dieses Enzyms in der sogenannten *Expressed Enzymatic Ligation* ermöglichte [Machova et al., 2003]. Da diese Chargen jedoch nicht mehr kommerziell erhältlich sind und bis zum heutigen Zeitpunkt keine fremdaktivitätsfreie Enzymcharge zur Verfügung steht, blieb die Verwendung von V8-Protease zur Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10 (C68A) bislang aus.

Im Fall eines möglichen Einsatzes gereinigter V8-Protease wäre ein limitierender Einfluß der Kondensationsreaktionen von Par63-SMe/SCm analog der von Par43-SSe/SPhOH auf die Ausbeute an Syntheseprodukt durchaus denkbar (vgl. 3.3.2). Prinzipiell würde die Synthese der Par63-Thioester ausgehend vom pTXB1-Vektor (Par63XB Intein-Fusionsprotein) nach

dem optimierten Reinigungsprotokoll erfolgen (vgl. 3.2.2), um Kondensationsprodukt-freien Thioester für die Synthese von Parvulin zu erhalten. Die Anwendbarkeit dieser Synthese- und Reinigungsstrategie für Par63-Thioester konnte bereits sichergestellt werden.

3.3.2 Trypsin D189K/K60E-katalysierte Ligationsreaktionen

Neben V8-Protease sollte weiterhin das Potential der Trypsinvariante D189K/K60E zur Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10 untersucht werden. Mit diesem Ziel erfolgte zunächst deren Expression als inaktiver Präkursor unter Nutzung des pYT-Systems sowie deren Aktivierung und Reinigung nach ursprünglich von Hedstrom entwickelten Protokollen [Hedstrom et al., 1992]. Die Trypsinvariante konnte in einer Ausbeute von 5-6 mg pro Liter Kulturüberstand und in hoher Reinheit erhalten werden, wie die SDS-PAGE und das RP-HPLC-Profil in Abb. 31 zeigen. Das gereinigte Protein wurde mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. Der errechnete Wert von 23812 Da konnte durch den bestimmten Wert von 23807 Da im Rahmen der Fehlergrenze bestätigt werden.

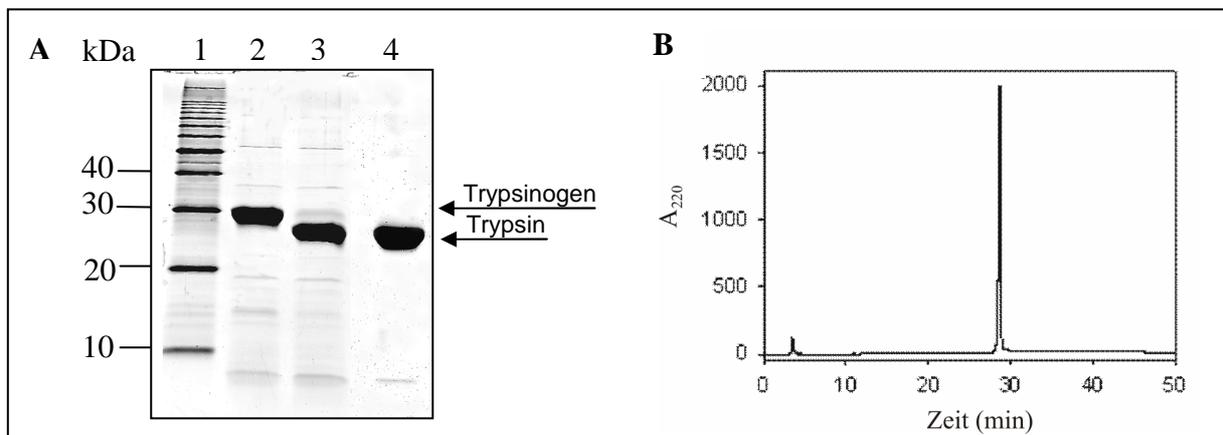


Abb. 31: SDS-PAGE der Reinigung und Aktivierung von Trypsin D189K/K60E (A) und RP-HPLC-Profil des gereinigten Proteins (B). Bahn 1: 10 kDa Molekulare-Masse-Standard, **Bahn 2:** Trypsinogen D189K/K60E: isoliert aus dem Kulturüberstand mittels Kationenaustauscher Toyopearl 650M, **Bahn 3:** Trypsinogenaktivierung, **Bahn 4:** Trypsin D189K/K60E: gereinigt mit dem starken Anionenaustauscher 20HQ. (15% Acrylamid, Coomassiefärbung).

Im Hinblick auf die Synthese einer in der Umgebung der putativen Substratbindungstasche fluoreszenzmarkierten Parvulinvariante (vgl. Kapitel 1, Abb. 1) wurde der Tyrosinrest 90 im C-terminalen Parvulinfragment gegen den Fluoreszenzmarker β -Naphthylalanin (im Weiteren mit X bezeichnet) ausgetauscht (Abb. 32).

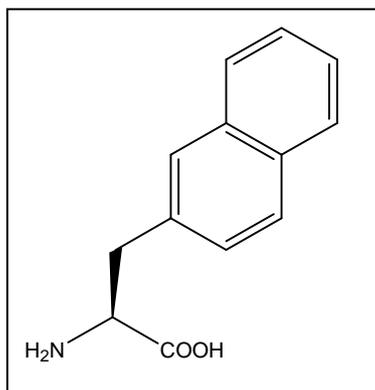


Abb. 32: Chemische Struktur von β -(2-Naphthyl)-L-alanin (X).

Wie unter 3.3.1 ausgeführt, ist die Akzeptanz der langkettigen Ausgangsstoffe durch das Enzym Voraussetzung für die erfolgreiche Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin C68A. Demzufolge wurde zunächst die generelle Eignung des Substratmimetikums Par43-SPhOH und des C-terminalen Fragmentes Par44-92 (C68A/Y90X) in separaten Trypsin D189K/K60E-katalysierten Modellreaktionen untersucht. Wiederum diene Harnstoff zur Verbesserung der Löslichkeit der Reaktanten, nachdem zunächst die Aktivität der Trypsinvariante in 2 M Harnstoff sichergestellt werden konnte (Abb. 33).

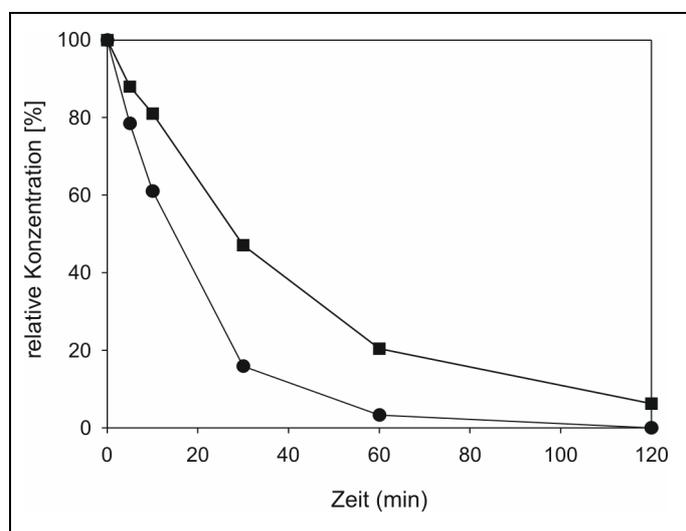


Abb. 33: Trypsin D189K/K60E-katalysierte Hydrolyse von Ac-Tyr-OMe ohne \bullet und in Gegenwart von 2 M Harnstoff \blacksquare . [Ac-Tyr-OMe] = 2 mM, [Trypsin D189K/K60E] = $4,8 \times 10^{-6}$ M, 0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl_2 , pH 8,0, 30 °C.

Zur Untersuchung der Akzeptanz des langkettigen Substratmimetikums durch Trypsin D189K/K60E wurden Ligationsreaktionen mit dem Modellpeptid RIVDAVLEQVKAAGAY durchgeführt, welches von der Trypsinvariante aufgrund der Präferenz von Arg bzw. Lys im S1'-Bindungsort bekanntermaßen sehr effizient acyliert wird [Rall, 2004]. Die Darstellung des Substratmimetikums Par43-SPhOH erfolgte ausgehend von Par43-SSe analog 3.3.1

parallel durch Zugabe des Thiols zum Ligationsansatz. Der Nachweis eines erfolgreichen Ligationsverlaufes konnte durch massenspektrometrische Analyse des Syntheseproduktes erbracht werden (Abb. 34). Innerhalb von vier Stunden fand ein vollständiger Umsatz des Par43-Thioesters statt, wobei nicht nur eine enzymatische Umsetzung zum gewünschten Syntheseprodukt erfolgte, sondern ebenfalls die spontane Bildung weiterer Produkte mit Massen von 4554 und 9102 beobachtet wurde. Diese Produkte sind auf intra- und intermolekulare Kondensationsreaktionen des Par43-SSe bzw. Par43-SPhOH zurückzuführen (3.3.3).

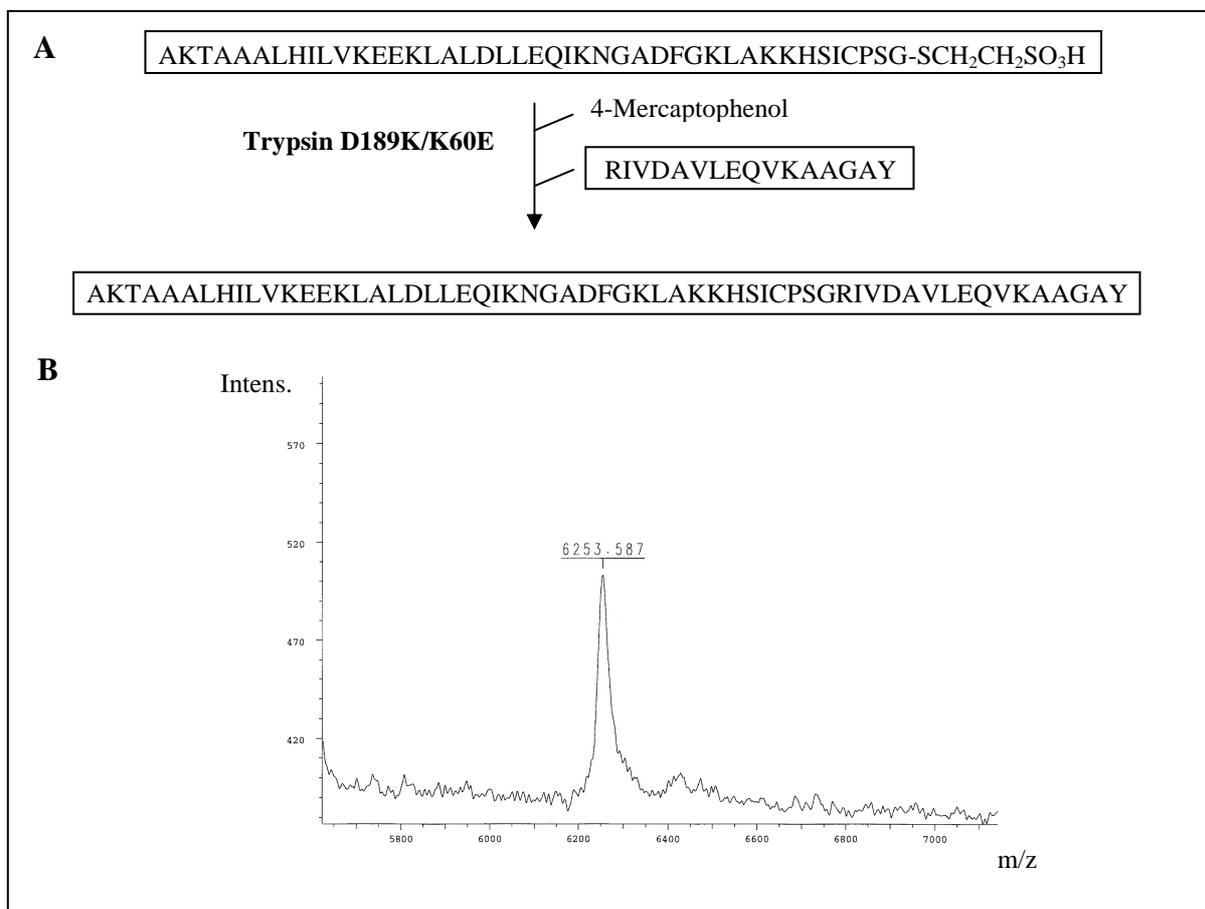


Abb. 34: Schema der Ligation von Par43-SSe/SPhOH und dem Modellpeptid RIVDAVLEQVKAAGAY katalysiert durch Trypsin D189K/K60E (A) sowie MALDI-ToF-Massenspektrum des Syntheseproduktes (B). [Par43-SSe] = 0,1 mM; [16mer] = 7 mM; [Trypsin D189K/K60E] = 5,6 μ M; [4-Mercaptophenol] = 4 mM; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0. Reaktionszeit: 4 h; Ligationsprodukt: m/z (berechnet): 6253; m/z (bestimmt): 6254.

Da das Substratmimetikum trotz Gegenwart des Biokatalysators vorzugsweise in einer spontanen Reaktion in seine Kondensationsprodukte überführt wurde, konnte die Ausbeute an Syntheseprodukt aufgrund einer zu geringen Konzentration nicht exakt bestimmt werden. Weitere Bemühungen zur Quantifizierung der Syntheseausbeute wurden im Hinblick auf die

Zielstellung dieser Modellreaktion nicht unternommen, da die bestimmte molekulare Masse des Syntheseproduktes (m/z : 6254) den prinzipiellen Nachweis für die Akzeptanz des Esters erbrachte. Um eine spontane Ligation beider Fragmente auszuschließen, wurde ein Ansatz ohne Enzym mitgeführt. Dieser lieferte während der gewählten Reaktionszeit keinen Hinweis auf eine spontane Produktbildung. Somit konnte erstmals die enzymatische Umsetzung eines langkettigen Substratmimetikums durch Trypsin D189K/K60E experimentell nachgewiesen werden, was das hohe Synthesepotential dieses Biokatalysators belegt.

Aufgrund der beobachteten spontanen Kondensationsreaktionen des Par43-SSe, respektive Par43-SPhOH, während der bereits beschriebenen Protease-katalysierten Modellreaktion wurde im weiteren Verlauf eine „Natürlich Chemische Ligations-Reaktion“ [Dawson et al., 1994] durchgeführt, um die spontane Reaktivität der Par43-Thioester in Abwesenheit des Enzyms abzuschätzen. Dazu wurde Par43-SSe mit dem Peptid CD36 [Leung et al., 1992], welches *N*-terminal ein Cystein trägt, inkubiert und die Reaktion mittels RP-HPLC sowie MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert (Abb. 35).

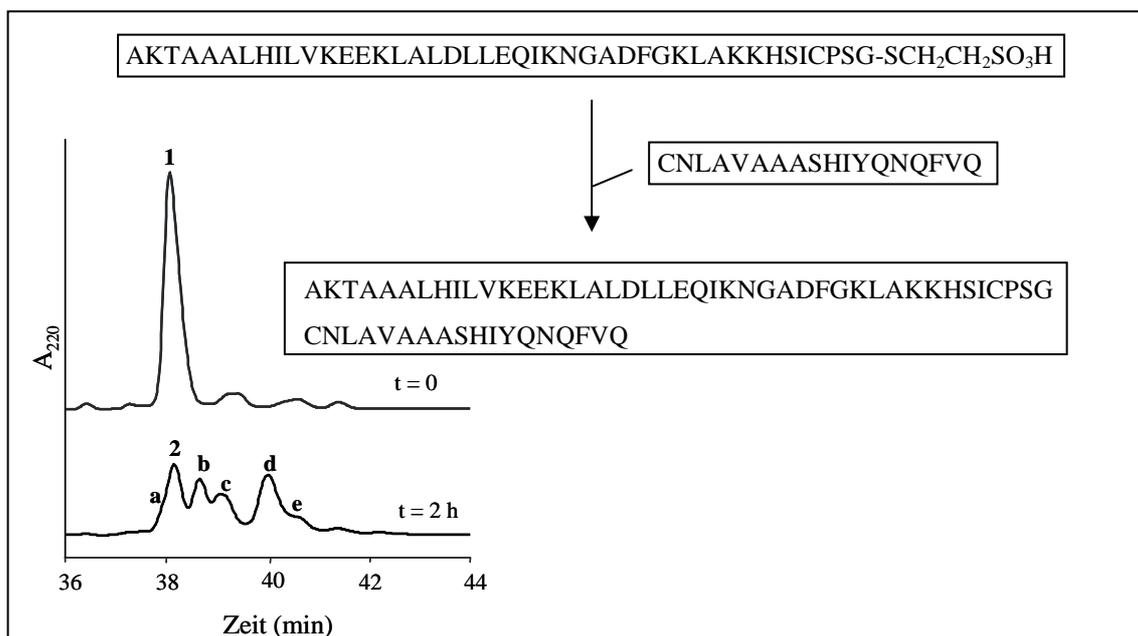


Abb. 35: Natürlich Chemische Ligation von Par43-SSe und Cys-CD36. Die Reaktion wurde mittels RP-HPLC und MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. **1:** Par43-SSe, **2:** Hydrolyseprodukt, **a:** Ligationsprodukt, m/z (berechnet): 6531, m/z (bestimmt): 6530, **b, c:** intramolekulare Kondensationsprodukte, **d, e:** intermolekulare Kondensationsprodukte. t : Reaktionszeit der Ligation. [Par43-SSe] = 1 mM; [Cys-CD36] = 1 mM; 50 mM Natriumphosphat, 6 M GdmHCl, 5 mM TCEP, pH 7,8.

Auch in diesem Fall erfolgte hauptsächlich die Detektion der spontan gebildeten Produkte **b-e**, die auf intra- und intermolekulare Kondensationsreaktionen des Par43-Thioesters zurück-

zuführen sind (vgl. 3.3.3). Dies ist Ausdruck der außergewöhnlichen Reaktivität des Par43-Thioesters, da bisher in der Literatur beschriebene NCL-Reaktionen unabhängig vom Vorhandensein weiterer nukleophiler Aminosäurereste innerhalb der Peptid-Sequenzen ausschließlich in der selektiven Reaktion zwischen der Thioesterfunktion des einen und dem *N*-terminalen Cystein des anderen Peptidfragmentes resultierten [Dawson et al., 1994]. Im Gegensatz dazu reagiert Par43-SSe selbst in Gegenwart des *N*-terminalen Cys-Peptides bevorzugt mit nukleophilen Resten seiner eigenen Sequenz (Abb. 35).

Zur Überprüfung der Eignung des *C*-terminalen fluoreszenzmarkierten Parvulinfragmentes Par44-92 (C68A/Y90X) für Trypsin D189K/K60E-katalysierte Synthesereaktionen wurde eine Modellreaktion mit dem für die Trypsinvariante etablierten kurzkettigen Substratmimetikum Bz-Gly-SPhOH durchgeführt. Wie das MALDI-ToF-Massenspektrum des Syntheseproduktes Bz-Gly-Par44-92 (C68A/Y90X) in Abb. 36 zeigt, stellt das *C*-terminale Fragment einen geeigneten langkettigen Acylakzeptor für Trypsin D189K/K60E-katalysierte Acyltransferreaktionen dar. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten und vollständigem Esterumsatz abgestoppt und analysiert. Die Ausbeute an Syntheseprodukt betrug 44% und wurde anhand einer für Par44-92 (C68A/Y90X) erstellten Eichgeraden durch Messung der Fluoreszenz des β -Naphthylalanins bei einer Emissionswellenlänge von 320 nm und verschiedenen Konzentrationen ermittelt. Zur Überprüfung einer spontanen Produktbildung im Sinne einer spontanen Aminolyse wurde ein Reaktionsansatz ohne Enzym mitgeführt. Es wurde nach 30 Minuten keine spontane Produktbildung beobachtet.

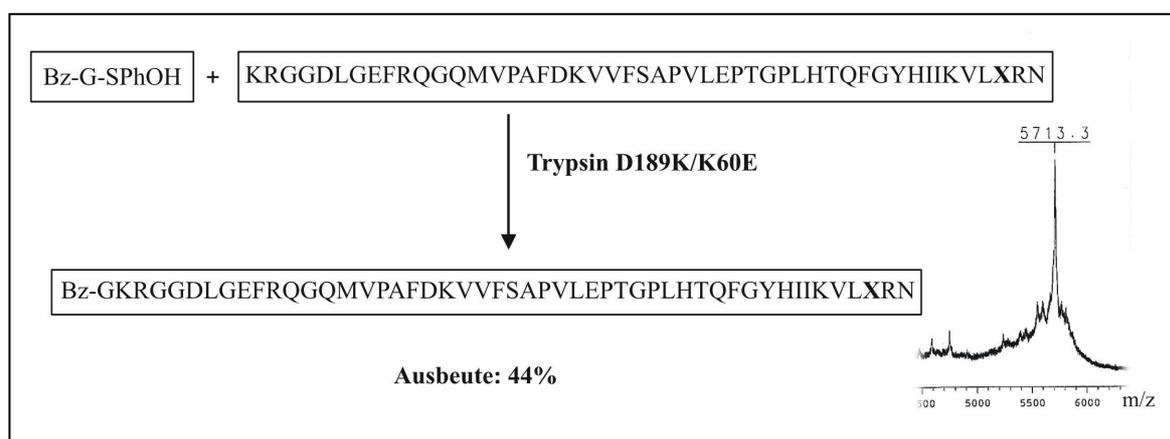


Abb. 36: Syntheschema und MALDI-ToF-Massenspektrum von Bz-Gly-Par44-92 (C68A/Y90X). [Bz-Gly-SPhOH] = 1 mM; [Par44-92 (C68A/Y90X)] = 1 mM; [Trypsin D189K/K60E] = 67,5 μ M; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0. Reaktionszeit: 30 min, Ligationsprodukt: m/z (berechnet): 5711; m/z (bestimmt): 5713.

Die durchgeführten Modellreaktionen demonstrieren die Akzeptanz der langkettigen *N*- bzw. *C*-terminalen Fragmente Par43-S_{Se}, respektive Par43-SPhOH, bzw. Par44-92 (C68A/Y90X) durch die Trypsinvariante D189K/K60E. Die gewünschten Syntheseprodukte konnten in jedem Fall erhalten werden, wobei signifikante proteolytische Nebenreaktionen nicht beobachtet wurden. Allerdings reagierte ein Großteil der Peptid-Thioester Par43-S_{Se} bzw. Par43-SPhOH in einer spontanen Reaktion zu intra- und intermolekularen Kondensationsprodukten. Diese konnte selbst durch Zugabe der Trypsinvariante und eines spezifischen Acylakzeptors (enzymatische Ligation) oder eines *N*-terminalen Cys-Peptids (NCL) nicht unterdrückt werden, was die Einzigartigkeit der Reaktivität der Parvulinfragment-Thioester verdeutlicht. Damit konnte gezeigt werden, daß nicht die Protease Limitation der neu entwickelten Methode ist, sondern vielmehr die Instabilität der Par43-Thioester, welche im Folgenden untersucht wurde.

3.3.3 Untersuchungen zur Stabilität der Parvulinfragment-Thioester

Aus den Ergebnissen zur Synthese der Par43- bzw. Par63-Thioester sowie den durchgeführten Umesterungs- sowie Ligrationsreaktionen läßt sich zunächst folgendes zusammenfassen. Bei der direkten Synthese der Parvulinfragment-Thioester Par63-S_{Se}, -SC_m-, -S_{Me} und Par43-S_{Se} sowie der indirekten Synthese der Substratmimetika Par63-SC_m und Par43-SPhOH mittels Umesterung eines Ausgangsesters wurden lediglich marginale Zyklisierungsraten erhalten (3.2.1 und 3.2.2). Eine stärkere Bildung von Kondensationsprodukten wird hingegen aufgrund einer gegenüber Par43-S_{Se} geringeren Syntheseausbeute für den Par43-SPhOH vermutet (3.2.2). Alle Synthese- und Umesterungsreaktionen wurden unter neutralen pH-Bedingungen durchgeführt. Bei der Aufreinigung des Par43-S_{Se} unter sauren Bedingungen (pH 1,0) wurde die Entstehung von Kondensationsprodukten nicht beobachtet (3.2.2). Eine erhebliche Bildung der Nebenprodukte erfolgte stattdessen bei den durchgeführten Ligrationsreaktionen unter Einsatz von Par43-S_{Se} sowie Par43-SPhOH unter basischen Bedingungen (3.3.2). Hingegen konnte in Ligrationsreaktionen mit Par63-S_{Me}/SC_m die Bildung von Kondensationsprodukten nicht beobachtet werden, da ein proteolytischer Abbau der Thioester erfolgte (3.3.1). Somit läßt sich schlußfolgern, daß die Kondensationsreaktionen generell unabhängig vom verwendeten Parvulinfragment sowie der Thioester-Funktion auftreten und mit steigendem pH-Wert zunehmende Zyklisierungsraten resultieren. Um sicherzustellen, daß im Fall des Par43-S_{Se}/SPhOH das Ausmaß der Nebenreaktion und damit auch die Ausbeute an synthetisiertem Thioester von der verwendeten Thioester-Funktion abhängt (vgl. 3.2.2), erfolgte eine HPLC-chromatographische Analyse der Thioester direkt nach deren Elution von

der Chitinsäule, wobei unter identischen pH-Bedingungen gearbeitet wurde. Aus Abb. 37 wird ersichtlich, daß für Par43-SPhOH im Vergleich zum Par43-SSe tatsächlich eine stärkere Bildung von Kondensationsprodukten vorliegt. Daraus geht eine Abhängigkeit der Zyklisierungsrate von der verwendeten Thioester-Funktion hervor, die auf eine höhere Reaktivität der 4-Hydroxyphenylthioester- gegenüber der Sulfonylthioester-Gruppe zurückzuführen ist.

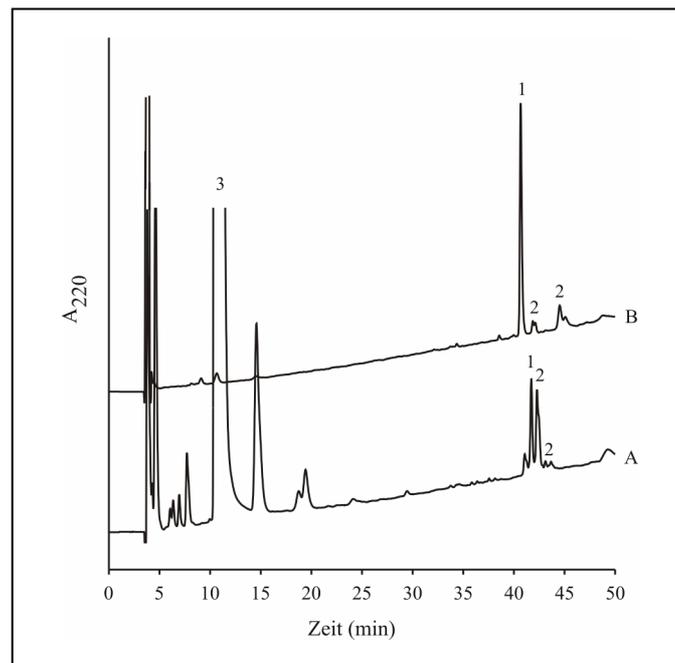


Abb. 37: RP-HPLC-Profil des nach Intein-vermittelter Spaltung erhaltenen Par43-SPhOH (A) im Vergleich zum Par43-SSe (B). A) 1: Par43-SPhOH, 2: Kondensationsprodukte von Par43-SPhOH, 3: 4-Mercaptophenol, B) 1: Par43-SSe, 2: Kondensationsprodukte von Par43-SSe.

Aufgrund der Tatsache, daß unter basischen Bedingungen die Kondensationsreaktionen von Par43-SSe/SPhOH die Ausbeute an Syntheseprodukt entscheidend limitieren, erfolgten im weiteren Verlauf am Beispiel des Par43-SSe Stabilitätsuntersuchungen unter Ligationsbedingungen. Dafür wurde Par43-SSe in dem für die enzymatische Ligationsreaktion verwendeten Reaktionspuffer (0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0) inkubiert und die Stabilität in Zeitabhängigkeit mittels RP-HPLC und MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. Generell wurde die Bildung von Produkten mit der Masse $M_{\text{Par43-SSe}}-142$ sowie $2M_{\text{Par43-SSe}}-142$ bzw. -284 nachgewiesen. Da diese Produkte auf einen nukleophilen Angriff ausgehend von Seitenketten der Aminosäuren innerhalb der Parvulinsequenz auf das Carbonyl-C-Atom der Thioester-Funktion desselben bzw. eines anderen Moleküls zurückzuführen sind und folglich ein bzw. mehrere Thiolmoleküle abgespalten werden, wurden die im Zuge dieser Reaktionen gebildeten Nebenprodukte als intra- bzw. intermolekulare Kondensationsprodukte bezeichnet. Verfolgt man die

Kondensationsreaktionen unter den genannten Bedingungen in Zeitabhängigkeit, so stellt man fest, daß bereits nach 1 Minute ein neuer Peak **a** entsteht, dessen massenspektrometrische Analyse ein intramolekulares Kondensationsprodukt offenbart (Abb. 38). Im weiteren Verlauf (vgl. 30 Minutenwert) werden neben diesem Hauptpeak weitere Kondensationsprodukte detektiert, wobei **b** und **c** intramolekular und **d** bzw. **e** intermolekular verknüpft sind. Da nach 6 Stunden die intramolekularen Kondensationsprodukte **b** und **c** dominieren und das primär gebildete Kondensationsprodukt **a** vollständig verbraucht ist, kann geschlußfolgert werden, daß die weiteren Kondensationsprodukte **b-e** aus dem primär gebildeten Kondensationsprodukt **a** hervorgegangen sind. Einen weiteren Anhaltspunkt dafür liefert die Tatsache, daß entsprechend Abb. 39 der Parvulinfragment-Thioester nach 15 Minuten vollständig umgesetzt wurde. Desweiteren wurden die intermolekularen Kondensationsprodukte in primäre umgewandelt, wie das Verschwinden der entsprechenden Peaks **d** und **e** zeigt.

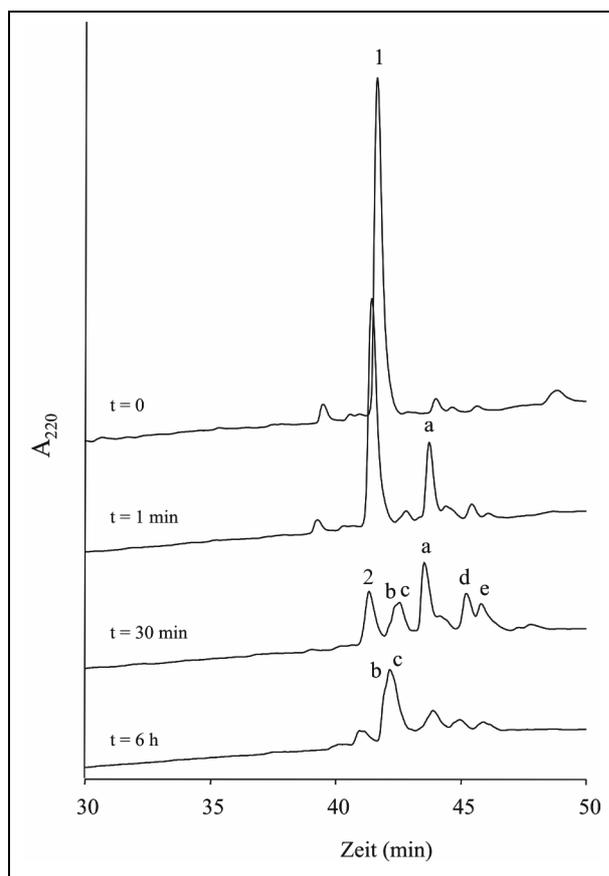


Abb. 38: Stabilität von Par43-SSe unter Ligationsbedingungen. **1:** Par43-SSe, **2:** Hydrolyseprodukt, **a-c:** intramolekulare Kondensationsprodukte, **d und e:** intermolekulare Kondensationsprodukte. **t:** Reaktionszeit. [Par43-SSe] = 1 mM; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0.

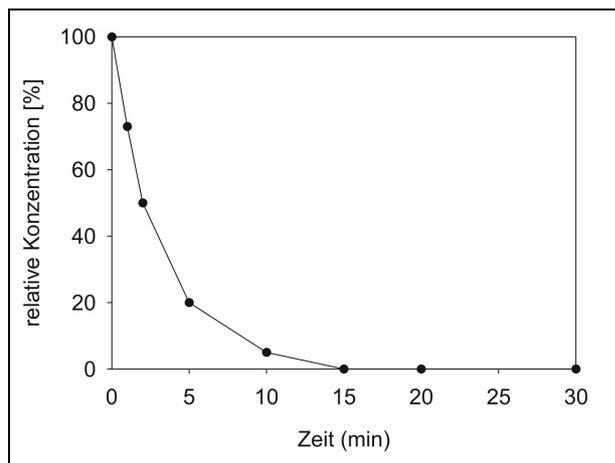


Abb. 39: Stabilität von Par43-SSe unter Ligationsbedingungen. [Par43-SSe] = 1 mM; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0.

Somit läßt sich zusammenfassen, daß in einer schnellen Reaktion ein primäres intramolekulares Kondensationsprodukt gebildet wird, welches sich langsam in weitere sekundäre Zyklisierungsprodukte umwandelt. Demnach sollte lediglich ein Aminosäurerest für die beobachteten Kondensationsreaktionen des Parvulinfragment-Thioesters verantwortlich sein.

Um Informationen über die Art der geknüpften Bindungen in den gebildeten Kondensationsprodukten zu erhalten, wurde deren Stabilität unter stärker basischen Bedingungen (pH 10,0) untersucht. Da alle Kondensationsprodukte unter diesen Bedingungen instabil sind, wie das Verschwinden der entsprechenden Peaks **b-g** in Abb. 40 zeigt, konnte auf die Bildung von Ester- bzw. Thioester-verknüpften intra- und intermolekularen Peptiden geschlossen werden. Desweiteren wurde festgestellt, daß unter den gewählten Bedingungen die Bildung intramolekularer Kondensationsprodukte **b** und **c** gegenüber der Bildung

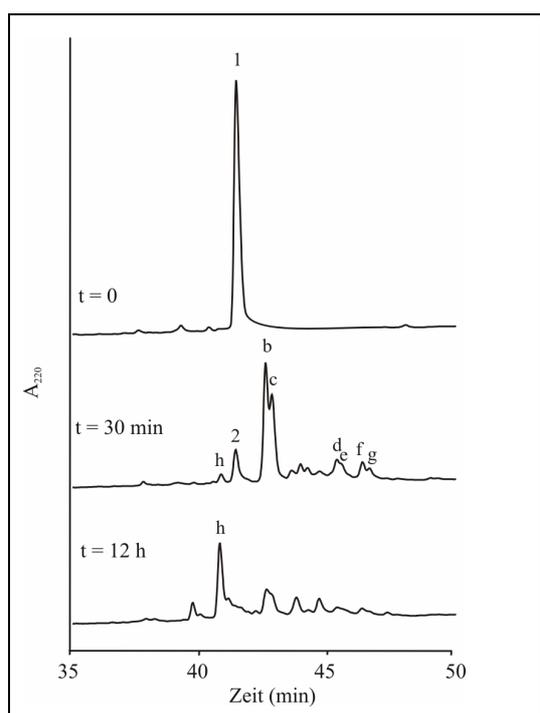


Abb. 40: Stabilität von Par43-SSe bei pH 10,0. **1:** Par43-SSe, **2:** Hydrolyseprodukt, **b, c** und **h:** intramolekulare Kondensationsprodukte, **d-g:** intermolekulare Kondensationsprodukte. [Par43-SSe] = 1 mM; 10 mM CAPS, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 10,0.

intermolekularer Kondensationsprodukte **d-g** bevorzugt ist. Außerdem wurden alle Kondensationsprodukte in das intramolekulare Kondensationsprodukt **h** umgewandelt, welches aufgrund seiner Basenstabilität offensichtlich über eine Amidbindung verknüpft ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde als Ursache für die beobachteten Kondensationsreaktionen des Par43-SSe eine nukleophile Substitutionsreaktion vermutet, bei der eine Hydroxyl- bzw. Sulfhydryl-enthaltende Lewis-Base als Nukleophil reagiert und das elektrophile Thioester-Carbonyl-C-Atom angreift. Somit kommen folgende Reste innerhalb der Sequenz des Par43-SSe für einen nukleophilen Angriff in Frage: Thr3, Ser38, Cys40 und Ser42 (Abb. 41).

AKT₃AAALHILVKEEKLALDLLEQIKNGADFGKLA~~KKH~~~~S₃₈~~~~IC₄₀~~~~PS₄₂~~G-SCH₂CH₂SO₃H

Abb. 41: Sequenz des Par43-SSe. Rot hervorgehoben sind die Hydroxyl- bzw. Sulfhydryl-enthaltenden Aminosäurereste Thr3, Ser38, Cys40 und Ser42.

Generell kommen dabei solche Aminosäurereste in die engere Auswahl, die in unmittelbarer räumlicher Nähe zur Thioester-Funktion des Gly43 stehen. Demzufolge wurde das Parvulinfragment 1-43 hinsichtlich der Einnahme einer Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie untersucht (Abb. 42). Ein Vergleich mit dem CD-Spektrum des Vollängenproteins Parvulin 10 zeigte in beiden Fällen das Auftreten von Minima bei 206 bzw. 208 nm sowie 221 nm, welche charakteristisch für α -Helices sind. Durch Analyse des Fern-UV-CD-Spektrums des Parvulinfragmentes mit dem Programm SSE-338 wurde ein Gehalt von 13,9% α -helikalen, 43,6% β -Faltblatt-, 4% Turn und 38,5% Random coil Strukturen berechnet. Somit weist das Parvulinfragment sowohl α -helikale als auch β -Faltblattstrukturelemente auf. Dies ist insofern nicht unerwartet, als daß die zwischen Gly43 und Lys44 vorgenommene Teilung von *E. coli* Parvulin, einem α/β -Protein, in zwei Fragmenten resultiert, die sowohl α -helikale als auch β -Faltblattstrukturen enthalten (vgl. Abb. 17).

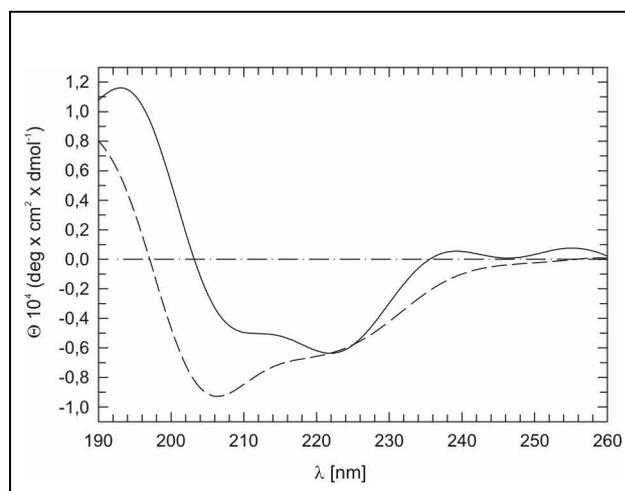


Abb. 42: Fern-UV-CD-Spektrum von Par43 (---) im Vergleich zu dem des rPar10 (—). Die Messungen wurden mit 3 bzw. 15 μ M Protein in 5 mM Natriumphosphat, pH 7,5 in einer 0,1 cm Küvette bei 20 °C durchgeführt.

Nachdem für das Parvulinfragment die Einnahme einer Sekundärstruktur nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden geklärt werden, welcher Aminosäurerest sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Gly43 befindet. Da die Struktur des Parvulinfragmentes nicht verfügbar ist, wurde die des Gesamtproteins zugrunde gelegt (Abb. 43). Dies ist in Näherung prinzipiell möglich, da die für das Vollängenprotein charakteristischen α/β -Sekundärstrukturelemente im Parvulinfragment vertreten sind. Es konnten mit dem Cysteinrest 40 und dem Serinrest 42 zwei Aminosäurereste identifiziert werden, die sich unmittelbar zum Gly43 befinden. Mit dem Programm Swiss-PdbViewer 3.7 wurde zwischen dem Schwefelatom der Thiolgruppe des Cys40 und dem Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe des Gly43 ein Abstand von 5,17 Å ermittelt. Das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des Ser42 ist hingegen in der nativen Struktur des Par10 6,39 Å vom Carbonylkohlenstoffatom des Gly43 entfernt.

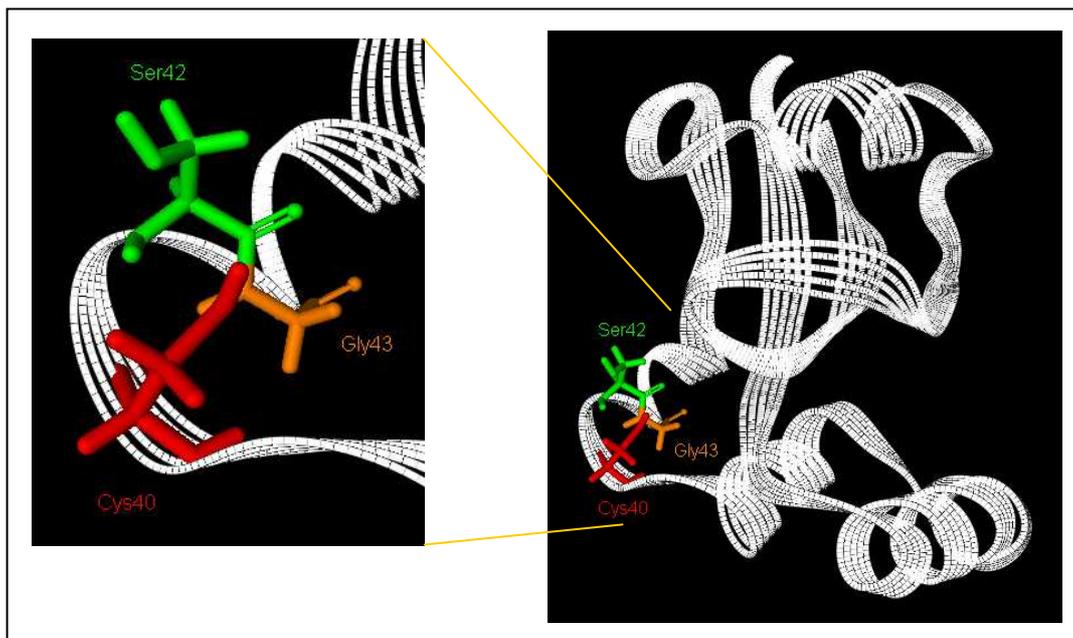


Abb. 43: NMR-Struktur von Parvulin 10. Die nukleophilen Seitenketten der Aminosäurereste Ser42 und Cys40 befinden sich in unmittelbarer Umgebung zum Gly43. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm DS ViewerPro (1JNT.pdb).

Obwohl der Cysteinrest 40 in der Primärsequenz weiter vom Carbonyl-C-Atom der Thioesterfunktion entfernt ist als der Serinrest 42, hat der erstgenannte den geringsten Abstand in der Struktur. Aufgrund dieser unmittelbaren Nähe von Cys40 und der Tatsache, daß Cystein wegen der nukleophilen Natur der Thiolgruppe die reaktivste Aminosäure in Proteinen darstellt [Lundblad & Noyes, 1984], wurde vermutet, daß die Seitenkette des Cys40 die Kondensationsreaktionen durch einen nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-C-Atom der

Thioester-Funktion initiiert, wobei primär ein Thioester-verknüpftes Kondensationsprodukt resultiert, welches anschließend beispielsweise durch die Hydroxylgruppe des Ser38 oder Ser42 erneut angegriffen werden kann.

Auf der Basis dieser Überlegungen sowie der experimentellen Befunde ergeben sich für die Protease-katalysierte Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10 zwei Strategien, einerseits die kinetische Kontrolle der Kondensationsreaktionen sowie andererseits deren Verminderung bzw. bestenfalls vollständige Inhibierung. Eine generelle Möglichkeit zur Verminderung der Kondensationsreaktionen stellt das Herabsetzen des pH-Wertes dar, weil experimentell nachgewiesen wurde, daß diese Reaktionen im sauren Milieu unterdrückt werden (vgl. 3.2.2). Allerdings sinkt die effektive Nukleophilkonzentration $[\text{Nu}]_{\text{effektiv}}$ der Acylakzeptorkomponente, welche der Konzentration des deprotonierten Nukleophils entspricht, mit Abnahme des pH-Wertes ebenfalls. Die Konzentration des deprotonierten Nukleophils $[\text{Nu}]_{\text{effektiv}}$ berechnet sich entsprechend Henderson-Hasselbalch nach Gleichung 3.1. Da die Deacylierung des Acylenzymintermediates durch die nukleophile Acylakzeptorkomponente nur durch deren deprotonierte Form erfolgen kann, führt ein niedrigerer pH-Wert zu einer verminderten Syntheseausbeute, weshalb für die Enzym-katalysierte Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin eine Manipulation des pH-Wertes ausgeschlossen wurde.

$$[\text{Nu}]_{\text{effektiv}} = \frac{[\text{Nu}]}{1 + 10^{\text{pK}-\text{pH}}} \quad (3.1)$$

$[\text{Nu}]_{\text{effektiv}}$	Konzentration des deprotonierten Nukleophils
$[\text{Nu}]$:	totale Nukleophilkonzentration
pK:	pK_a -Wert

Zur Unterdrückung der Kondensationsreaktionen existiert weiterhin die Möglichkeit der Einführung einer Punktmutation. Allerdings kam im Hinblick auf die Erzeugung von aktivem Parvulin ein Austausch des katalytisch essentiellen Cys40 nicht in Betracht. Ebenfalls scheint eine Verschiebung der Ligationsstelle nicht sinnvoll, da dies zumindest im Fall des Par63-Fragmentes keine stabilen Thioester liefert (Abb. 44). Analog zum Par43-SSE wurde der Par63-SSE unter Ligationsbedingungen nach kurzer Zeit vollständig zu dessen Hydrolyse-

produkt sowie Kondensationsprodukten umgewandelt, obwohl der Cysteinrest 40 sowohl einen größeren Abstand zum Carbonylkohlenstoffatom des Lys63 in der Primärsequenz (23 Aminosäuren) als auch in der Struktur des Parvulin 10 (21,08 Å) im Vergleich zum Par43-Fragment aufzeigt. Hier liegt der Cys40-Rest lediglich drei Aminosäurereste in der Primärsequenz und 5,17 Å in der Struktur des Vollängenproteins vom Carbonylkohlenstoffatom des Gly43 entfernt.

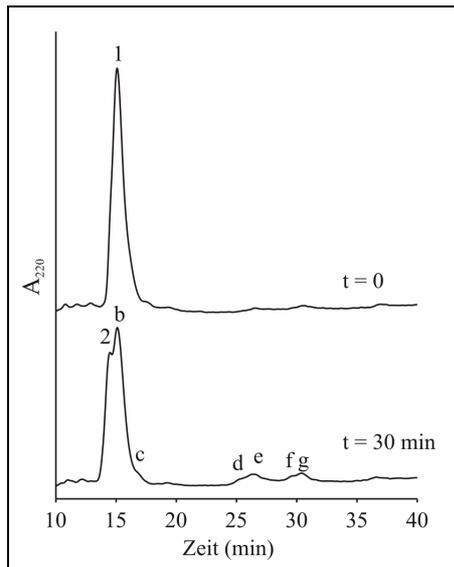


Abb. 44: Stabilität von Par63-SSe unter Ligationsbedingungen. **1:** Par63-SSe, **2:** Hydrolyseprodukt von Par63-SSe, **b und c:** intramolekulare Kondensationsprodukte, **d-g:** intermolekulare Kondensationsprodukte. [Par63-SSe] = 1 mM; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, pH 8,0.

Aufgrund der experimentellen Hinweise, daß der Aminosäurerest Cystein in Position 40 für die Kondensationsreaktionen verantwortlich ist, stellt dessen temporäre Blockierung einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt zur Erzeugung stabiler Thioester dar, welche keinen Kondensationsreaktionen mehr unterliegen. Bei der zuerst genannten Strategie, die im folgenden Abschnitt vorgestellt wird, sollte die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion gegenüber der der Kondensationsreaktionen gesteigert werden, um höhere Produktausbeuten zu erzielen (kinetische Kontrolle der Kondensationsreaktionen).

3.4 Synthese von Parvulin unter kinetischer Kontrolle der Kondensationsreaktionen

Da die Substratmimetika-vermittelte Proteasekatalyse der Michaelis-Menten-Kinetik folgt, ergibt sich eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v der katalysierten Reaktion von der Substratkonzentration $[S]$. Dabei zeigt sich v anfangs proportional zu $[S]$, bis bei Substratsättigung die Maximalgeschwindigkeit erreicht wird [Thormann et al., 1999]. Weil die Reaktionsgeschwindigkeit solcher enzymatischer Reaktionen generell durch Erhöhung der Substratkonzentration gesteigert werden kann, wurde die Konzentration von Par43-SSe zur

Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin von 0,1 auf 1,0 mM heraufgesetzt. Um nochmals die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion gegenüber der spontanen Kondensationsreaktionen zu erhöhen, erfolgte gleichzeitig der Einsatz von 65 μM statt 5,6 μM Enzym. Analog zur Modellreaktion (3.3.2) wurde das Substratmimetikum parallel durch Zugabe von 4 mM 4-Mercaptophenol hergestellt. Ebenso diente ein harnstoffhaltiger Puffer (2 M) zur Verbesserung der Löslichkeit der Reaktanten. Das C-terminale fluoreszenzmarkierte Parvulinfragment Par44-92 (C68A/Y90X) kam in einer Konzentration von 1,4 mM zur Anwendung. Die Ligationsreaktion wurde durch Zugabe der Trypsinvariante gestartet und aufgrund der schnellen spontanen Kondensationsreaktionen des Par43-SSe nur über 30 min verfolgt (3.3.3). Der Ligationsansatz wurde mittels Perfusionschromatographie aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen massenspektrometrisch analysiert. Ebenso erfolgte eine Analyse des Ansatzes mittels RP-HPLC. Das gewünschte Syntheseprodukt Par10 (C68A/Y90X) konnte mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie identifiziert werden (Abb. 45A). Allerdings ist auch unter diesen Bedingungen die spontane Bildung der Kondensationsprodukte **b-g** gegenüber der enzymatischen Bildung des Syntheseproduktes bevorzugt, wie das analytische RP-HPLC Profil in Abb. 45B zeigt. Demzufolge führte die vorgenommene Erhöhung der Substrat- und Enzymkonzentration nicht zu der gewünschten Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit der Enzym-katalysierten Reaktion gegenüber der Kondensationsreaktionen. Auf eine weitere Erhöhung der Enzymkonzentration wurde im Sinne einer Enzym-„Katalyse“ verzichtet. Ebenso konnte die Substratkonzentration aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht weiter erhöht werden.

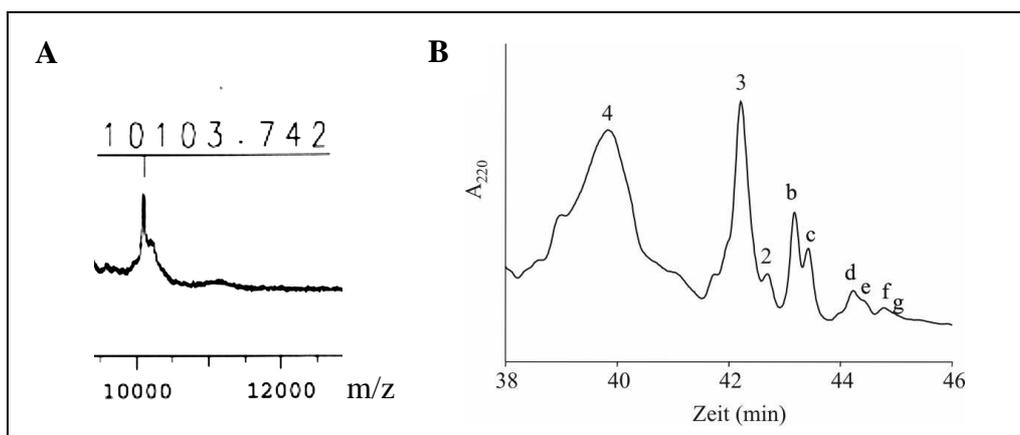


Abb. 45: Trypsin D189K/K60E-katalysierte Synthese von Parvulin 10 (C68A/Y90X). A) MALDI-ToF-Massenspektrum des Syntheseproduktes. m/z (berechnet): 10101; m/z (bestimmt): 10104. B) Analytisches RP-HPLC-Profil des Ligationsansatzes. 2: Hydrolyseprodukt, b, c: intramolekulare Kondensationsprodukte, d-g: intermolekulare Kondensationsprodukte, 3: 4-Mercaptophenol-Dimer, 4: Par44-92 (C68A/Y90X). [Par43-SSe] = 1 mM, [Par44-92 (C68A/Y90X)] = 1,4 mM, [4-Mercaptophenol] = 4 mM, [Trypsin D189K/K60E] = 65 μM ; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, pH 8,0, Reaktionszeit: 30 min.

Zur Untersuchung einer spontanen Ligation wurde ein Ansatz ohne Enzym mitgeführt, welcher in gleicher Weise wie der enzymatische Ansatz (mit Trypsinvariante) behandelt wurde. Eine spontane Ligation, auch spontane Aminolyse genannt, ist zwischen der aktivierten Thioester-Funktion am C-Terminus des Par43-Fragmentes und der N-terminalen Amino-Funktion von Par44-92 (C68A/Y90X) prinzipiell möglich und führt konsequenterweise zur kovalenten Verknüpfung beider Fragmente über eine Amidbindung. Es wurde nach 30 Minuten spontan gebildetes Ligationsprodukt massenspektrometrisch nachgewiesen, was eine kovalente Verknüpfung belegt.

Da aufgrund der geringen Konzentrationen an synthetisiertem Syntheseprodukt keine exakte Quantifizierung mittels RP-HPLC möglich war, sollte im Weiteren die Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10 indirekt über Aktivitätsmessungen bestimmt werden. Auf diese Weise könnte geklärt werden, ob das Syntheseprodukt katalytisch aktiv ist und, vor allem, wirklich Trypsin D189K/K60E-katalysiert gebildet wird. Unter der Annahme, daß entsprechend Abb. 46 eine Trypsin D189K/K60E-katalysierte kovalente Knüpfung der Parvulinfragmente zu einer korrekt gefalteten und damit katalytisch aktiven Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase führt, sollte eine Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung Parvulin-spezifischer Substrate während des Syntheseverlaufes detektiert werden können. Somit handelt es sich bei diesem Test um einen funktionalen, welcher sowohl die Protease-

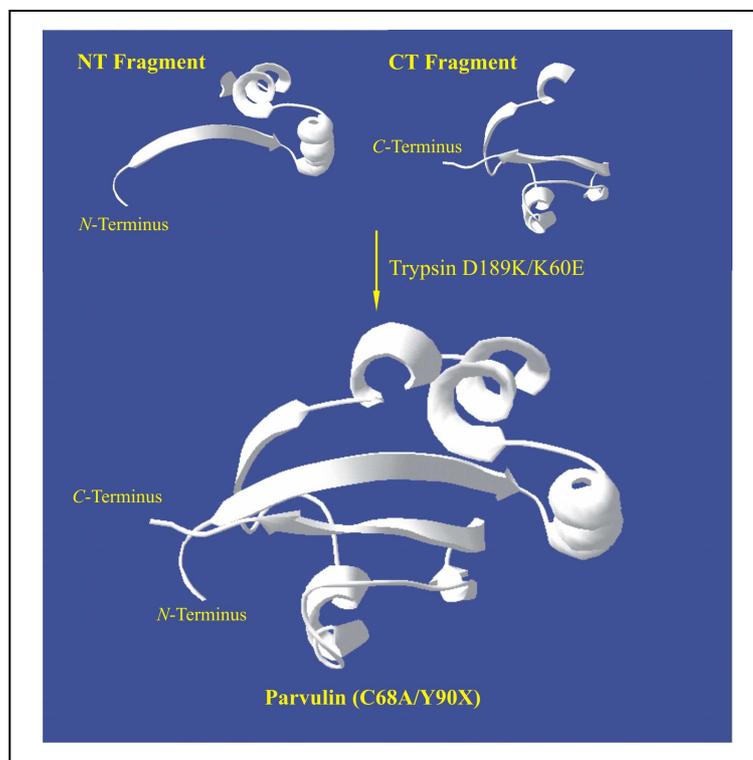


Abb. 46: Trypsin D189K/K60E-katalysierte Synthese von *E. coli* Parvulin (C68A/Y90X). Die tatsächlichen Strukturen der Parvulinfragmente sind unbekannt und wurden zur Darstellung mit dem Programm Swiss-PdbViewer 3.7 der nativen Proteinstruktur des Par10 entnommen (1JNT.pdb). NT: N-terminal, CT: C-terminal.

katalysierte Ligation beider Fragmente als auch die Einnahme einer nativen bzw. nativ-ähnlichen Struktur voraussetzt. Zur Untersuchung spontaner Reaktionen wurde ein Ansatz ohne Synthesekatalysator mitgeführt. Denkbar wären die Assoziation und/oder die spontane Ligation beider Proteinfragmente, woraufhin in beiden Fällen infolge der Komplementierung der Proteinfragmente eine Aktivität des nicht-kovalenten bzw. kovalenten spontan gebildeten Syntheseproduktes meßbar sein könnte.

Alle durchgeführten Messungen zur Bestimmung von PPIase-Aktivitäten in den Reaktionsansätzen wurden im Chymotrypsin-gekoppelten Meßsystem durchgeführt, da für *E. coli* Parvulin 10 und Parvulinvarianten infolge niedriger Chymotrypsinkonzentrationen eine geringe Empfindlichkeit gegenüber dieser Protease nachgewiesen wurde [Schelbert, 1998]. Aufgrund einer erwarteten Instabilität des *N*- bzw. *C*-terminalen Parvulinfragmentes gegenüber Chymotrypsin sollte ausschließlich die synthetisierte fluoreszenzmarkierte Parvulinvariante C68A/Y90X im Ligationsansatz der Aktivitätsmessung zugänglich sein. Um dennoch eine PPIase-Aktivität der einzelnen Fragmente auszuschließen, wurde sowohl nur das *N*-terminale als auch nur das *C*-terminale Proteinfragment auf eine solche untersucht. Die Messungen erfolgten im Protease-freien Meßsystem [Janowski et al., 1997]. Die Verfolgung der Isomerisierung des Tetrapeptides Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA, welches ein effizientes Substrat für Parvulin und Parvulinvarianten darstellt [Schelbert, 1998], gelang durch Extinktionsmessungen nach einem Sprung einer Lösung von 0,55 M LiCl in Trifluorethanol in HEPES-Puffer bei 336 nm (Abb. 47). Nach einer nichtlinearen Regression entsprechend Gleichung 3.2 wurde die Geschwindigkeitskonstante k , welche im Gegensatz zum Protease-gekoppelten Test der Summe der *cis* nach *trans* sowie *trans* nach *cis* Reaktion entspricht, erhalten.

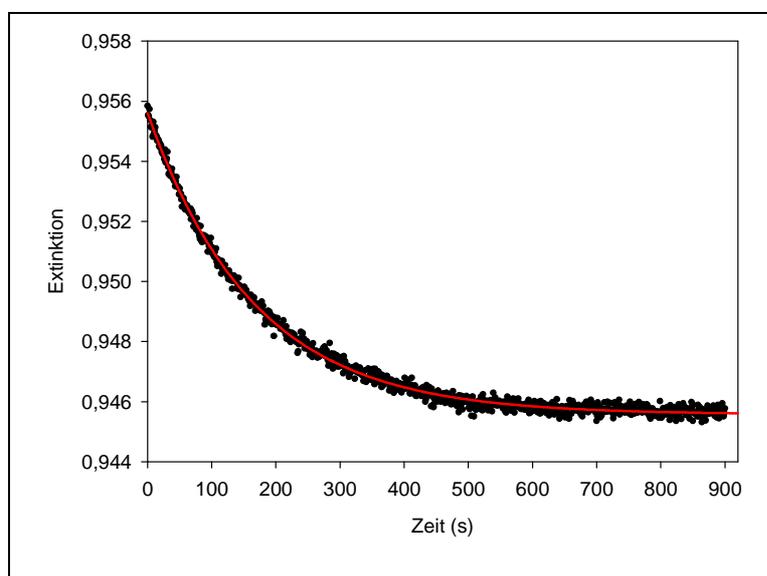


Abb. 47: LiCl-Sprung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 10 °C.

$$E = E_0 + ae^{-kt} \quad (3.2)$$

Die alleinige Gegenwart der Parvulinfragmente Par43-SSe bzw. Par44-92 (C68A/Y90X) führte zu keiner Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung des Substrates Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA.

Aufgrund der für Par10 und Par10-Varianten festgestellten bevorzugten Akzeptanz von Tetrapeptiden mit hydrophoben Aminosäureresten in P1-Position (Aminosäurerest vor dem Prolin) wurde für die Aktivitätsmessungen im Protease-gekoppelten Test ebenfalls das Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA eingesetzt [Schelbert, 1998]. Die langsame Isomerisierungsphase, welche einer Reaktion erster Ordnung folgt (Abb. 48), wurde einer nichtlinearen Regression entsprechend Gleichung 3.3 unterzogen.

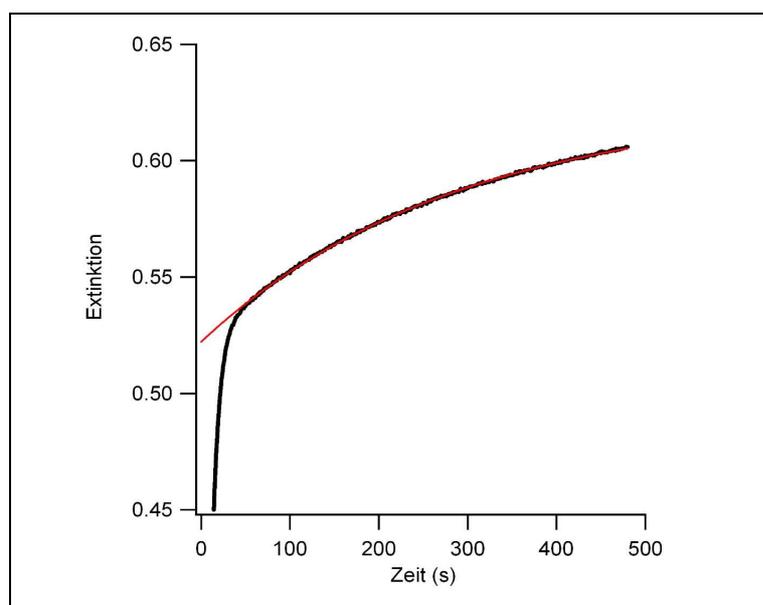


Abb. 48: Isomerspezifische Proteolyse von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA mit Chymotrypsin in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 10 °C. Die erste schnelle Phase grenzt sich deutlich von der zweiten langsamen Phase der Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ab. Die nichtlineare Regression der langsamen Isomerisierungsphase ist rot dargestellt.

$$E = E_0 + a(1 - e^{-kt}) \quad (3.3)$$

$$k_{\text{enz}} = k_{\text{beob}} - k_0 \quad (3.4)$$

Vor den Untersuchungen zur PPIase-Aktivität der Reaktionsansätze wurde die Stabilität des Tetrapeptides gegenüber der Trypsinvariante getestet. Bei Anwesenheit von Trypsin D189K/K60E im PPIase-Meßansatz zeigte sich keine Veränderung der zweiten kinetischen Phase, wodurch eine Spaltung der *cis*- bzw. *trans*-Spezies des Tetrapeptides durch die Trypsinvariante ausgeschlossen wurde.

Zur Analyse der Ligrationsreaktion sowie des spontanen Ansatzes wurde nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten ein Aliquot des jeweiligen Ansatzes für den Proteasegekoppelten PPIase-Test eingesetzt. In Abb. 49 sind die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen, speziell die gemäß Gleichung 3.4 ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten Reaktion k_{enz} , dargestellt. Es konnte durch Zugabe beider Ansätze zum Protease-gekoppelten PPIase-Test eine Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung des Tetrapeptides nachgewiesen werden. Ein direkter Vergleich der Daten ergab, daß durch Zugabe des Synthesekatalysators Trypsin D189K/K60E zu Par43-SSe/SPhOH und Par44-92 (C68A/Y90X) eine höhere PPIase-Aktivität erreicht wurde als bei Inkubation beider Proteinfragmente ohne Biokatalysator. Dieses Resultat belegt eine Katalyse der Bildung der Parvulinvariante Par10 (C68A/Y90X). Darüber hinaus konnte erstmals die Substratmimetika-vermittelte Proteasekatalysierte Synthese eines katalytisch aktiven fluoreszenzmarkierten Proteins demonstriert werden.

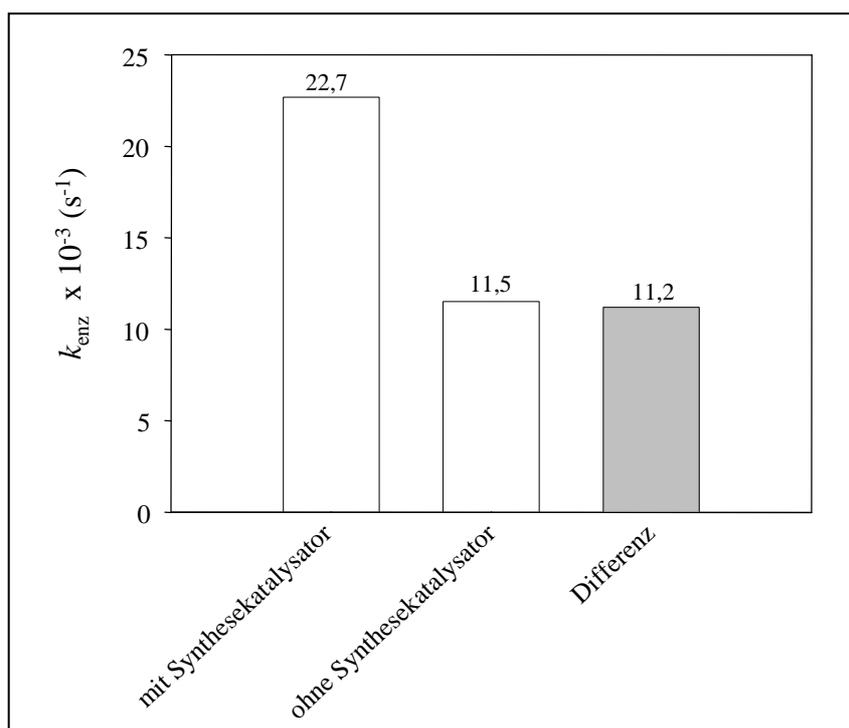


Abb. 49: Nachweis der katalytischen Aktivität der synthetisierten, fluoreszenzmarkierten Par10 Variante C68A/Y90X. Die Reaktionen wurden in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0 durchgeführt. Konzentrationen der Reaktanten A) im Ligrationsansatz bzw. spontanen Reaktionsansatz und B) im PPIase-Meßsystem. [Par43-SSe] = 1 mM (A) und 13,6 µM (B); [Par44-92 (C68A/Y90X)] = 1,4 mM (A) und 19,1 µM (B); [4-Mercaptophenol] = 4 mM (A) und 54,5 µM (B); [Trypsin D189K/K60E] = 65 µM (A) und 0,9 µM (B). Reaktionszeit: 30 min. Die Messungen wurden im Chymotrypsin-gekoppelten Meßsystem in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 10 °C durchgeführt.

Aus der Differenz der Geschwindigkeitskonstanten k_{enz} der Trypsin D189K/K60E-katalysierten und spontanen Reaktion wurde die tatsächliche Aktivität des enzymatisch

entstandenen Syntheseproduktes errechnet. Es ergab sich eine Beschleunigung der Geschwindigkeitskonstanten von $11,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Nicht korrekt gefaltetes Syntheseprodukt ist im PPIase-Test aufgrund der fehlenden Isomerase-Aktivität nicht detektierbar. Da für Parvulin ein vollständig reversibler Faltungsvorgang nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, daß das gesamte hergestellte Parvulin erfaßt wurde [Scholz et al., 1997]. Demnach beziehen sich alle in diesem Experiment ermittelten Daten auf das synthetisierte, katalytisch aktive Protein Parvulin C68A/Y90X.

Weil entsprechend Abb. 50 die Konzentration einer PPIase direkt proportional zur Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten Reaktion ist ($[PPIase] \sim k_{enz}$), kann bei Kenntnis der Spezifitätskonstanten k_{kat}/K_M die aktive Proteinkonzentration der PPIase entsprechend Gleichung 3.5 berechnet werden.

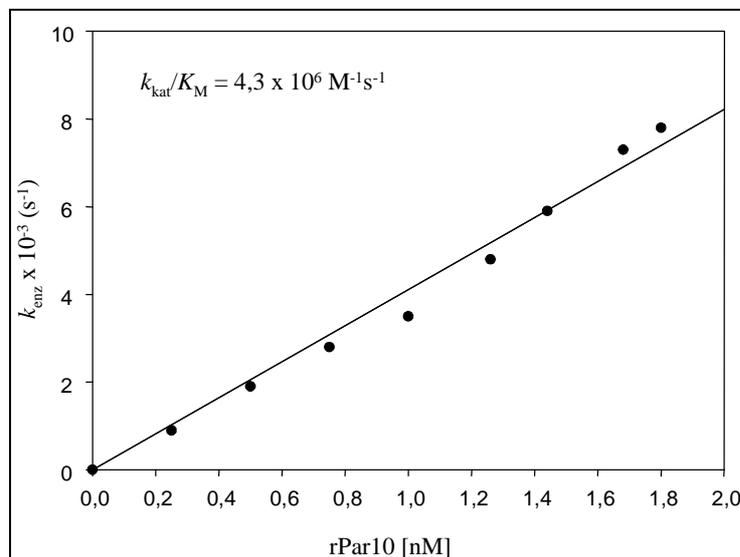


Abb. 50: Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA durch Parvulin 10 in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Messungen wurden im Chymotrypsin-gekoppelten Test in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 10 °C durchgeführt.

$$[PPIase] = k_{enz} / (k_{kat}/K_M) \quad (3.5)$$

Eine Abschätzung der Syntheseausbeute ist unter Einbeziehung bekannter Spezifitätskonstanten deshalb möglich. Da für die hergestellte Variante keine vorlag, wurde auf Literaturdaten von Wildtyp-Parvulin und 6xHis Par10 (C68A) zurückgegriffen. Jedoch kann nicht davon ausgegangen werden, daß die Spezifitätskonstante der hergestellten Variante identisch mit den verwendeten Referenzdaten ist, woraufhin die in Tab. 8 dargestellten Ausbeuten lediglich eine Größenordnung angeben.

Tab. 8: Berechnete Konzentrationen der synthetisierten, katalytisch aktiven Parvulinvariante C68A/Y90X im Ligationsansatz bzw. im spontanen Reaktionsansatz. a)¹: k_{kat}/K_M von 6xHis Par10 (C68A) = $2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; b): k_{kat}/K_M von rPar10 = $4,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Konzentration Par10 (C68A/Y90X)			
mit Trypsin D189K/K60E	ohne Trypsin D189K/K60E	Differenz	Ausbeute [%]
$8,0 \times 10^{-7} \text{ M}^{\text{a}}$	$3,8 \times 10^{-7} \text{ M}^{\text{a}}$	$4,2 \times 10^{-7} \text{ M}^{\text{a}}$	0,042 ^a
$3,9 \times 10^{-7} \text{ M}^{\text{b}}$	$2,0 \times 10^{-7} \text{ M}^{\text{b}}$	$1,9 \times 10^{-7} \text{ M}^{\text{b}}$	0,019 ^b

¹ [Schelbert, 1998]

3.4.1 Studien zur spontanen Parvulinsynthese

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, resultierte infolge der Zugabe des Reaktionsansatzes ohne Biokatalysator zum PPIase-Meßsystem eine Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung des Substrates Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA, was die spontane Synthese der Parvulinvariante C68A/Y90X indiziert. Für deren weitere Untersuchung wurde auf die Zugabe von 4-Mercaptophenol verzichtet, um festzustellen, ob eine Abhängigkeit der spontanen Produktbildung von der verwendeten Thioester-Funktion besteht. Sowohl die Durchführung der spontanen Synthesereaktion als auch die der Messung der PPIase-Aktivität des spontanen Reaktionsansatzes erfolgte analog 3.4.

Zur Analyse des Verlaufes der spontanen Parvulinsynthese wurde dem Enzym-freien Reaktionsansatz in einem Zeitintervall von 5-10 Minuten eine Probe entnommen und für den PPIase-Test eingesetzt. In Abb. 51 sind die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten Reaktion (k_{enz}) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit der spontanen Synthesereaktion dargestellt. Für die Geschwindigkeitskonstante k_{enz} der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung des Substrates Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA wurden exponentiell zunehmende Werte erhalten, die eine ebenfalls zeitabhängige spontane Produktbildung wiedergeben, welche nach 30 min einen Wert von $11,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ erreicht. Denkbar wäre eine Generierung der PPIase-Aktivität durch nicht-kovalente Assoziation beider Fragmente oder deren spontane Ligation. Obwohl letztere bereits mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestätigt wurde (vgl. 3.4), besteht interessanterweise keine Abhängigkeit der spontanen Produktbildung von der verwendeten Thioester-Funktion des Parvulinfragmentes –SPhOH (vgl. 3.4) bzw. –SSe, da sich die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten nicht wesentlich voneinander unterscheiden ($11,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. $11,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Für die spontane kovalente Bildung des Syntheseproduktes im Sinne einer spontanen Aminolyse würde man aufgrund der

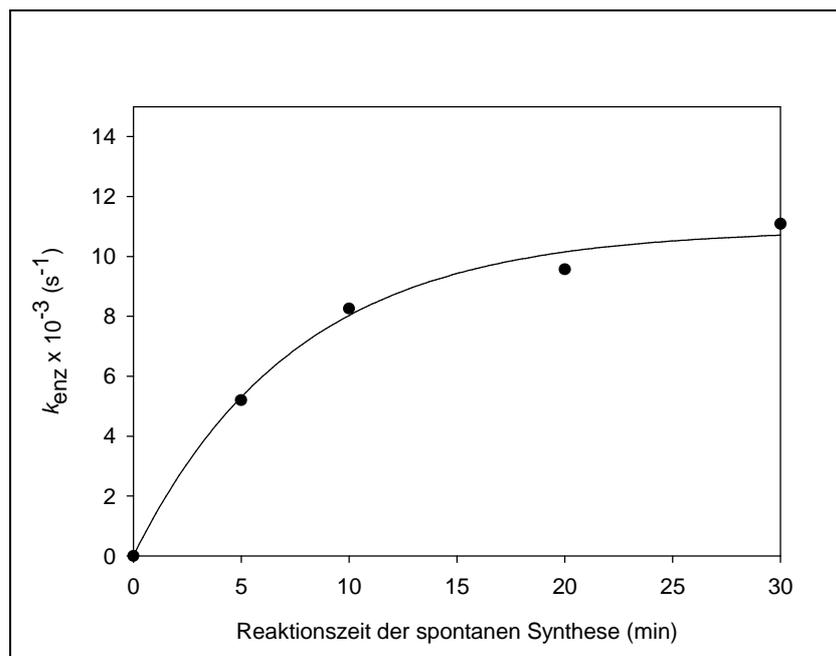


Abb. 51: Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA durch Inkubation der Parvulinfragmente Par43-SSe und Par44-92 (C68A/Y90X). Die Reaktion wurde in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M $CaCl_2$, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0 durchgeführt. Konzentrationen der Reaktanten A) im spontanen Reaktionsansatz und B) im PPIase-Meßsystem. [Par43-SSe] = 1,0 mM (A) und 13,6 μ M (B); [Par44-92 (C68A/Y90X)] = 1,4 mM (A) und 19,1 μ M (B). Die Messungen wurden im Chymotrypsin-gekoppelten Meßsystem in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 10 °C durchgeführt.

im Vergleich zur SPhOH- geringer reaktiven SSe-Funktion (vgl. 3.3.3) entsprechend weniger kovalentes Ligationsprodukt erwarten. Die Tatsache, daß eine solche Abhängigkeit nicht beobachtet wurde, läßt die Vermutung zu, daß der Anteil an kovalent gebildetem spontanen Ligationsprodukt nicht wesentlich zur spontanen Parvulinsynthese beiträgt, so daß zusätzlich eine Assoziationsreaktion, welche unabhängig von der verwendeten Ester-Funktion erfolgt, diskutiert wird.

Zur Untersuchung dessen, ob die beobachtete PPIase-Aktivität eine kovalente Verknüpfung beider Fragmente voraussetzt oder durch nicht-kovalente Wechselwirkungen entsteht, wurde die reaktive C-terminale Thioestergruppe des Par43-Fragmentes durch Zugabe von Natronlauge in die Säure-Funktion überführt und mit dem Parvulinfragment Par44-92 (C68A/Y90X) bei pH 8,0 inkubiert. In analoger Weise zum Par43-Thioester konnten für die Geschwindigkeitskonstanten zeitabhängig exponentiell zunehmende k_{enz} -Werte erhalten werden, was auf eine nicht-kovalente Assoziation der Proteinfragmente schließen läßt, in deren Folge PPIase-Aktivität meßbar ist (Abb. 52). Unter Einbeziehung der Studien in Kapitel 3.4 kann zusammengefaßt werden, daß sowohl aufgrund einer kovalenten Verknüpfung der Parvulinfragmente (spontane Aminolyse) als auch durch nicht-kovalente Wechselwirkungen der Parvulinfragmente ein katalytisch aktives Enzym entsteht. Da die ermittelten

Geschwindigkeitskonstanten praktisch identisch mit denen in Abb. 51 sind, kann weiterhin geschlußfolgert werden, daß die Assoziation der Parvulinfragmente wesentlich zur spontanen Parvulinsynthese beiträgt, vorausgesetzt, sowohl kovalentes als auch nicht-kovalentes Syntheseprodukt sind ähnlich aktiv.

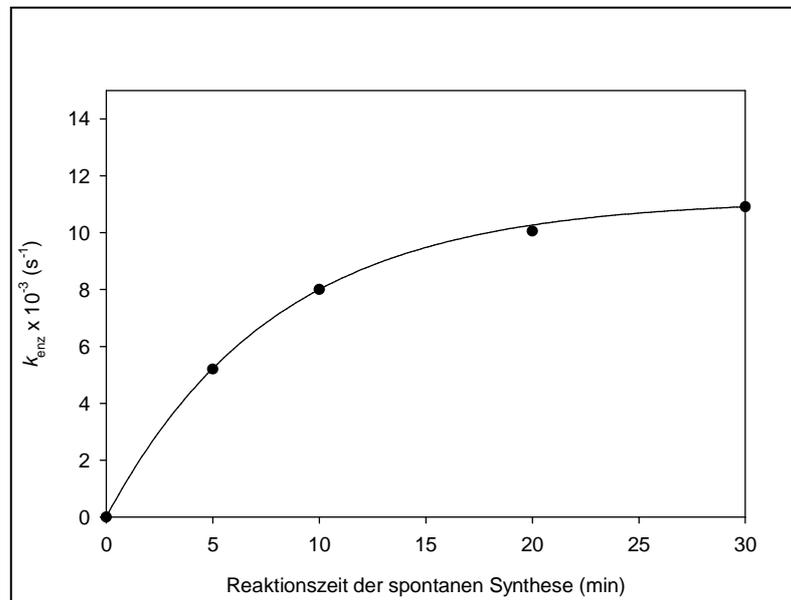


Abb. 52: Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA durch Inkubation von hydrolysiertem Par43-SSe und Par44-92 (C68A/Y90X). Die Reaktion wurde in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0 durchgeführt. Konzentrationen der Reaktanten A) im spontanen Reaktionsansatz und B) im PPIase-Meßsystem. [Par43-SSe] = 1,0 mM (A) und 13,6 µM (B); [Par44-92 (C68A/Y90X)] = 1,4 mM (A) und 19,1 µM (B). Die Messungen wurden im Chymotrypsin-gekoppelten Meßsystem in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 10 °C durchgeführt.

In einigen literaturbekannten Fällen wurde demonstriert, daß die Zusammenlagerung bzw. Komplementierung von Proteinfragmenten durch Ligation [Beligere & Dawson, 1999] oder Assoziation [Richards & Vithayathil, 1959] zum vollständigen Protein ein strukturtriebener Prozeß ist, wobei die Proteinfragmente aufgrund ihrer Vorstrukturierung als sogenannte Initiationsstellen für die Faltung des vollständigen Proteins agieren können. Die zugrundeliegende Ursache dieses Vorganges wird lokalen Interaktionen in der frühen Phase des Faltungsprozesses zugeschrieben [Dyson et al., 1992; Sancho & Fersht, 1992; Sancho et al., 1992; Waltho et al., 1993]. Nukleationspunkte für Proteinfaltungsprozesse sind dabei kurze Sekundärstrukturelemente, die sich sequenzabhängig spontan in Lösung ausbilden können und Initiationsstellen zur Faltung des Gesamtproteins darstellen. Der erste Hinweis auf eine strukturtriebene spontane Bildung der Parvulinvariante C68A/Y90X wurde bereits durch den direkten Vergleich der Reaktionsverläufe der beiden Estersubstrate Bz-Gly-SPhOH bzw. Par43-SPhOH und des Acylakzeptors Par44-92 (C68A/Y90X) erhalten. Während bei

Verwendung von Bz-Gly-SPhOH nach 30 Minuten keine spontane Produktbildung beobachtbar war (vgl. 3.3.2), wurde bei Einsatz des langkettigen Par43-SPhOH in dieser Zeit spontan gebildetes Produkt nachgewiesen (vgl. 3.4). Da sich beide Acyldonoren lediglich durch ihre Länge und somit der Fähigkeit zur Ausbildung von Strukturelementen unterscheiden, wurden weitere Studien zur Untersuchung der Struktur der Parvulinfragmente durchgeführt. Zunächst erfolgten Experimente zum Einfluß des Denaturants Harnstoff auf die Sekundärstrukturen der Parvulinfragmente 1-43 und 44-92 (C68A/Y90X), weil alle Reaktionen zur besseren Löslichkeit der Edukte in 2 M Harnstoff durchgeführt wurden. Während 2 M Harnstoff zu keiner signifikanten Veränderung der Sekundärstruktur des 49mer führte (Abb. 53B), wurde für das 43mer eine partielle Entfaltung beobachtet (Abb. 53A). Dennoch könnte letztgenanntes, ebenso wie das 49mer ausreichend strukturiert sein, um Initiationsstellen zur Faltung der vollständigen Parvulinvariante C68A/Y90X zu liefern.

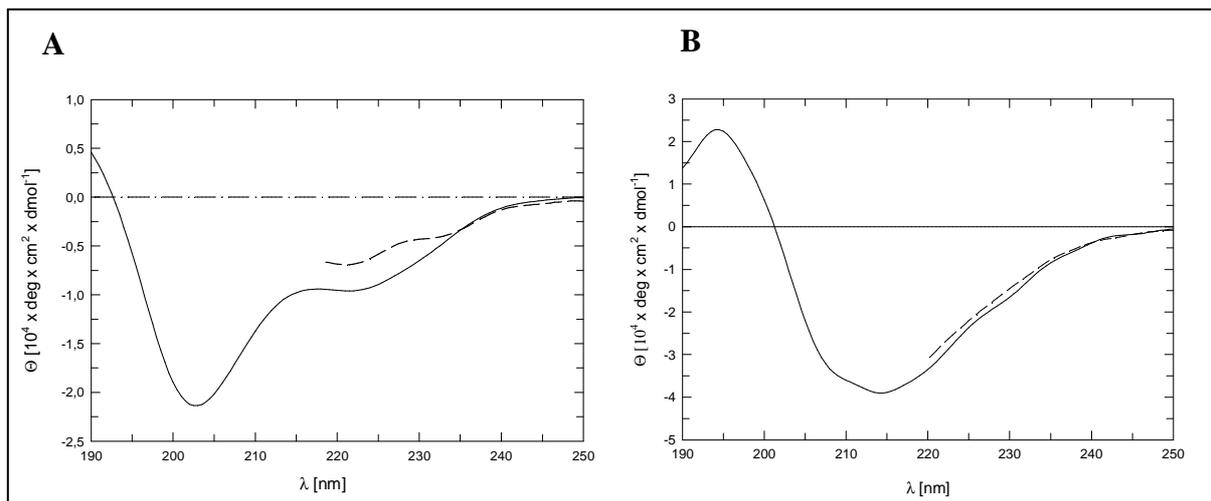


Abb. 53: Fern-UV-CD-Spektren von Parvulin 1-43 (A) und Parvulin 44-92 (C68A/Y90X) (B) in Abwesenheit (—) und Gegenwart (---) von 2 M Harnstoff. Die Messungen wurden mit 6 bzw. 15 μM Protein in 5 mM Natriumphosphat, pH 7,5 bei 20 °C durchgeführt.

Zur Überprüfung dessen, ob die gemessene spontane Produktbildung tatsächlich Konformations-getrieben verläuft, wurde eine spontane Reaktion in 6 M Harnstoff durchgeführt. Wildtyp-Parvulin liegt unter diesen Bedingungen vollständig denaturiert vor [Scholz et al., 1997]. Sollte eine Konformations-assistierte Komplementierung beider Fragmente vorliegen, so wäre eine geringere PPIase-Aktivität zu erwarten. In Abb. 54 ist die zeitabhängige Aktivitätsmessung des Enzym-freien Reaktionsansatzes in 6 M Harnstoff dargestellt. Zum direkten Vergleich wurde ebenfalls die spontane Reaktion in 2 M Harnstoff abgebildet. Deutlich werden aus der Grafik die geringeren Geschwindigkeitskonstanten, welche prinzipiell auf geringere Mengen aktiver PPIase hinweisen.

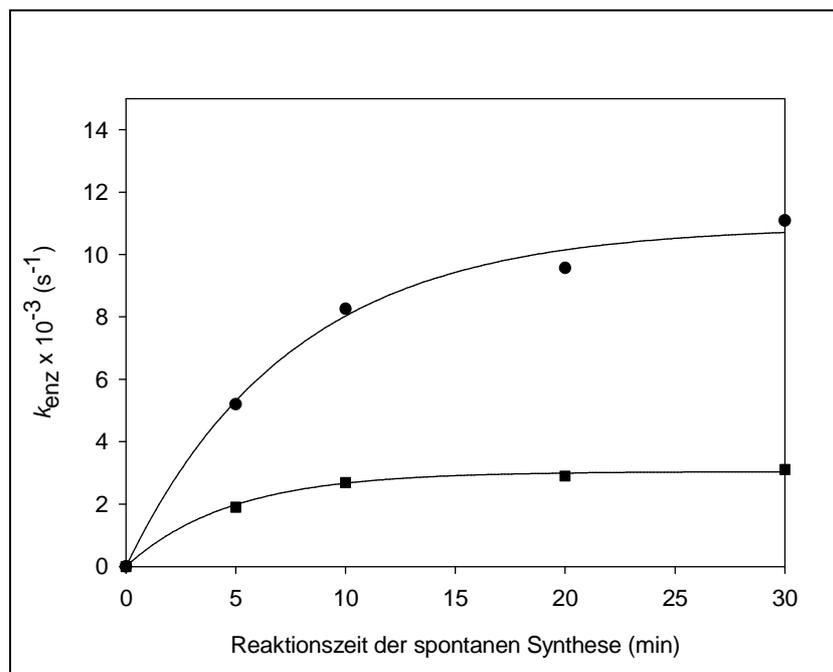


Abb. 54: Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA durch Inkubation der Parvulinfragmente Par43-SSe und Par44-92 (C68A/Y90X). Die Reaktion wurde in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, —●— 2 M bzw. —■— 6 M Harnstoff, pH 8,0 durchgeführt. Konzentrationen der Reaktanten A) im spontanen Reaktionsansatz und B) im PPIase-Meßsystem. [Par43-SSe] = 1,0 mM (A) und 13,6 µM (B); [Par44-92 (C68A/Y90X)] = 1,4 mM (A) und 19,1 µM (B). Die Messungen wurden im Chymotrypsin-gekoppelten Meßsystem in 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 10 °C durchgeführt.

Da in der Literatur bei Gegenwart von Harnstoff im Protease-gekoppelten PPIase-Meßsystem ein Aktivitätsverlust von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen beschrieben ist [Yu, 2003], wurde im folgenden der Einfluß von Harnstoff auf die PPIase-Aktivität der Parvulinvariante C68A/Y90X berücksichtigt. Weil die hergestellte Parvulinvariante nicht in Substanz vorlag, dienten Literaturdaten über die Harnstoffabhängigkeit der Aktivität von Wildtyp-Parvulin als Grundlage. Diese kann mit folgender Formel beschrieben werden:

$$k_{kor} = \frac{k_H}{e^{(b \times c_H)}} \quad (3.6)$$

Dabei stellt k_H die ermittelte Geschwindigkeitskonstante im Harnstoff-haltigen Meßsystem, b die Harnstoffabhängigkeit der natürlich logarithmischen Spezifitätskonstanten und c_H die im Meßsystem enthaltene Harnstoffkonzentration dar. Das Wildtyp Parvulin und die Literatur zugrundeliegend führten zum Ergebnis, daß eine verwendete Harnstoffkonzentration von 6 M die PPIase-Aktivität um maximal 10% reduziert. Demnach kann der Effekt von Harnstoff in den Aktivitätsmessungen vernachlässigt werden. Der beobachtete Verlust von Aktivität in Anwesenheit hoher Harnstoffkonzentrationen könnte folglich das Resultat der fehlenden

Struktur der Fragmente sein, womit eine Konformations-getriebene Zusammenlagerung beider Parvulinfragmente als Ursache der spontanen Proteinsynthese in Frage kommt.

3.5 Synthese von Parvulin unter temporärem Schutz der Cystein-Thiol-Funktion

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen an der Thiol-Funktion von Cysteinresten werden in der Peptidchemie Schutzgruppen wie die AcM- oder die Methylbenzylgruppe eingeführt, welche reversibel abspaltbar sind [Kocieński, 2003]. Allerdings können diese nicht chemoselektiv in ein fertiges Peptid eingeführt werden, da Nebenreaktionen mit anderen nukleophilen Seitenketten nicht auszuschließen sind. Eine selektive Reaktion wurde für die Maskierung der Thiol-Funktion von Cysteinresten in Peptiden mit Thiosulfonat beschrieben [Sato & Aimoto, 2003]. Eine effiziente Reaktion konnte jedoch nur unter basischen Bedingungen erzielt werden [Bednar et al., 1989], weshalb diese Schutzgruppe aufgrund der beobachteten Kondensationsreaktionen unter diesen Bedingungen nicht zum Einsatz kam. Obwohl zur Maskierung von Cysteinresten in Proteinen zahlreiche Modifizierungsreagenzien existieren, kommen diese im Hinblick auf eine selektive sowie reversible Reaktion am Cys40 des Parvulinfragmentes nicht in Frage [Cohen, 1968; Lundblad & Noyes, 1984]. So modifizieren beispielsweise *p*-Hydroxymercuribenzoat, Iodacetat und *N*-Ethylmaleinimid Cysteinreste irreversibel. Außerdem müssen Reaktionen mit anderen Nukleophilen in Betracht gezogen werden. Unter Berücksichtigung dessen, daß die Modifizierung des Cys40 im Par43-SSe aufgrund der beobachteten Kondensationsreaktionen (3.3.3) unter sauren Bedingungen durchgeführt werden sollte, wurde ebenfalls die Verwendung von Methanthiosulfonat-Reagenzien ausgeschlossen, weil eine effiziente Modifizierung nur unter basischen Bedingungen erzielt wurde [DeSantis et al., 1999; Khumtaveeporn et al., 2001; Matsumoto et al., 2002].

Da für die Lösung der Problemstellung keine geeignete Schutzgruppe zur Verfügung stand, wurde Ellman's Reagenz (DTNB) zur temporären Modifizierung des Cys40 verwendet. Ellman's Reagenz, welches üblicherweise zur Bestimmung der Anzahl von Cysteinresten in Proteinen eingesetzt wird [Ellman, 1959], reagiert mit freien Sulfhydrylgruppen in Proteinen unter Ausbildung einer Disulfidbrückenbindung zwischen dem Protein und einem 2-Nitro-5-thiobenzoessäure-Rest (NTB). Unter Ausnutzung der Selektivität und Reversibilität dieser Reaktion wurde Par43-SSe zur Maskierung des Cys40 mit DTNB bei pH 6,0 versetzt (Abb. 55). Durch den Einsatz eines 15fachen Überschusses an Reagenz konnte eine vollständige Modifizierung des Proteinfragment-Thioesters direkt nach Zugabe der DTNB-Lösung erzielt werden (Abb. 56A). Folglich wurde aufgrund der sauren Reaktionsbedingungen während der

Modifizierungsreaktion keine Bildung von Kondensationsprodukten festgestellt, jedoch die quantitative Darstellung von Cys(NTB)-geschütztem Par43-SSe. Aufgrund der NTB-Schutzgruppe konnte der Cystein-maskierte Thioester eindeutig durch Detektion bei 320 nm nachgewiesen werden. Ebenfalls bestätigte die massenspektrometrische Analyse des im Zuge der Modifizierungsreaktion neu entstandenen Peaks **2** einen erfolgreichen Reaktionsverlauf (Abb. 56B, m/z (berechnet): 4892; m/z (bestimmt): 4891). Das überschüssige DTNB wurde anschließend mittels präparativer HPLC entfernt.

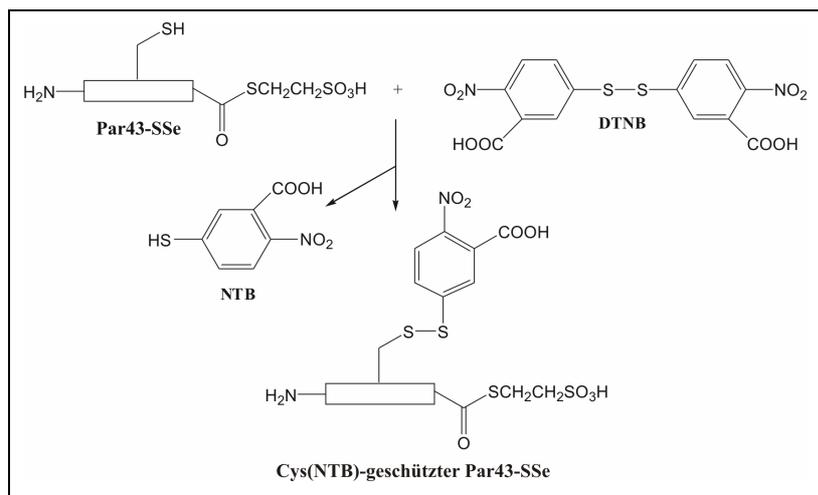


Abb. 55: Reaktionsschema der NTB-Modifizierung der Cys40-Thiol-Funktion des Par43-SSe durch Ellman's Reagenz. DTNB reagiert mit der freien Sulphydryl-Funktion des Cys40, wobei eine Disulfidbrückenbindung zwischen Par43-SSe und einem 2-Nitro-5-thiobenzoessäure-Rest ausgebildet wird.

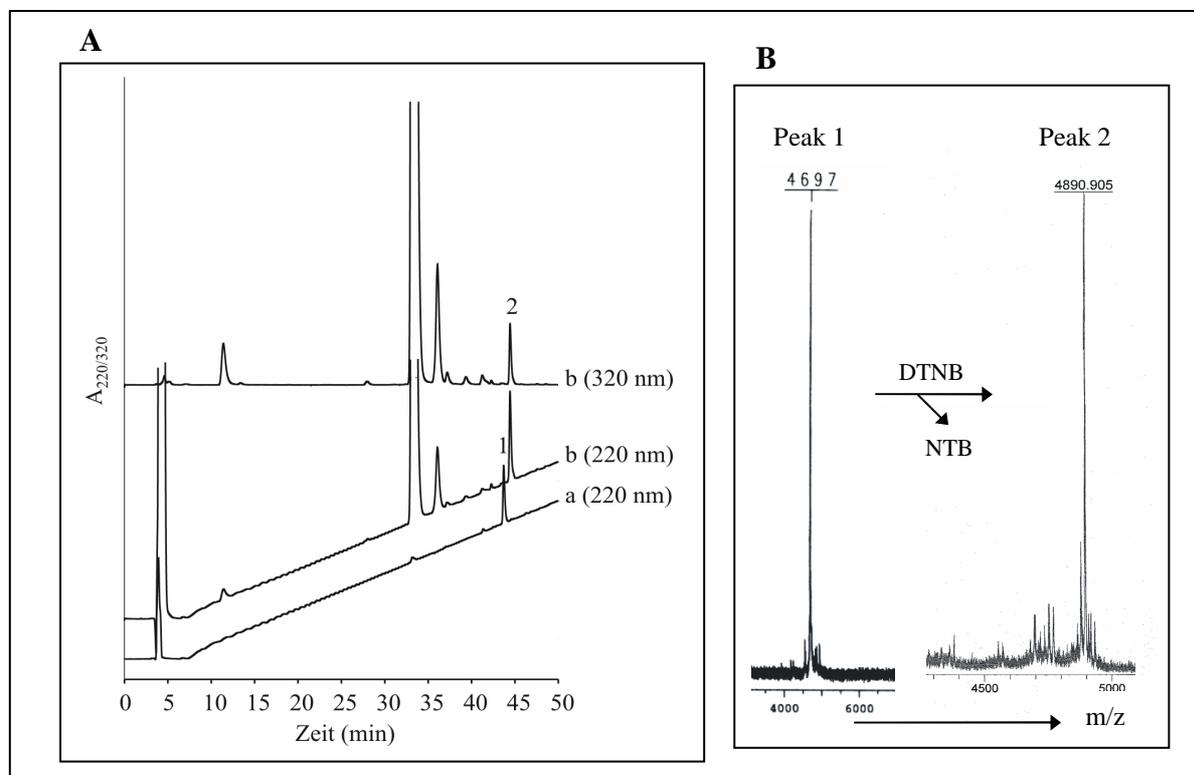


Abb. 56: HPLC-chromatographische (A) sowie massenspektrometrische (B) Analyse der Cys(NTB)-Modifizierung von Par43-SSe. a: Par43-SSe; Peak 1: Par43-SSe (m/z (berechnet): 4695; m/z (bestimmt): 4697), b: Modifizierungsansatz direkt nach Zugabe von DTNB, Peak 2: Cys(NTB)-Par43-SSe (m/z (berechnet): 4892; m/z (bestimmt): 4891); [Par43-SSe] = 1 mM, [DTNB] = 15 mM, 50 mM Natriumphosphat, 3,2 M GdmHCl, pH 6,0.

Zur Überprüfung der Stabilität des Cys40-geschützten Peptid-Thioesters wurde dieser bei pH 8,0 inkubiert. Die zeitabhängige chromatographische Analyse des Ansatzes zeigte, daß Cys(NTB)-geschützter Par43-SSe ausschließlich in sein Hydrolyseprodukt umgewandelt wurde (Abb. 57). Damit konnte der Cysteinrest 40 eindeutig als Initiationspunkt für die beobachteten Kondensationsreaktionen identifiziert werden.

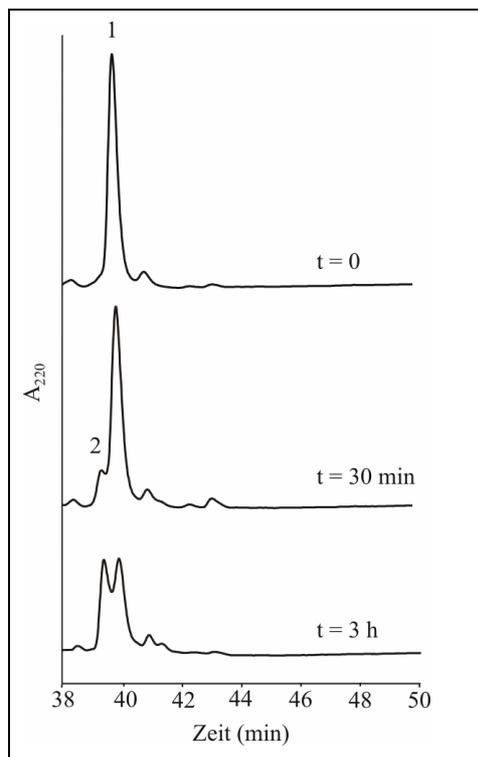


Abb. 57: Stabilität von Cys(NTB)-geschütztem Par43-SSe unter Ligationsbedingungen. 1: Par43-SSe, **2:** Hydrolyseprodukt, t = Reaktionszeit. [Cys(NTB)-Par43-SSe] = 1 mM; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 2 M Harnstoff, pH 8,0.

Zusammen mit den Ergebnissen aus 3.3.3 kann demnach das in Abb. 58 gezeigte spontane Reaktionsschema des Par43-SSe formuliert werden. Das Thioester-Carbonyl-C-Atom wird in einer ersten schnellen Reaktion von der Cystein-Seitenkette nukleophil angegriffen, woraufhin ein primäres Thioester-verknüpftes Kondensationsprodukt entsteht. Dieses kann nun seinerseits in langsamer verlaufenden Folgereaktionen durch andere Nukleophile wie beispielsweise die Seitenketten von Ser38 und Ser40 angegriffen werden, was die Bildung weiterer Peaks in den HPLC-Profilen erklärt (vgl. 3.3.3, Abb. 38: Peaks b und c). Diese Reaktionen, wie auch die intermolekularen Kondensationsreaktionen, welche nicht in Abb. 58 dargestellt sind, konnten durch Maskierung des reaktiven Cysteins erfolgreich inhibiert werden.

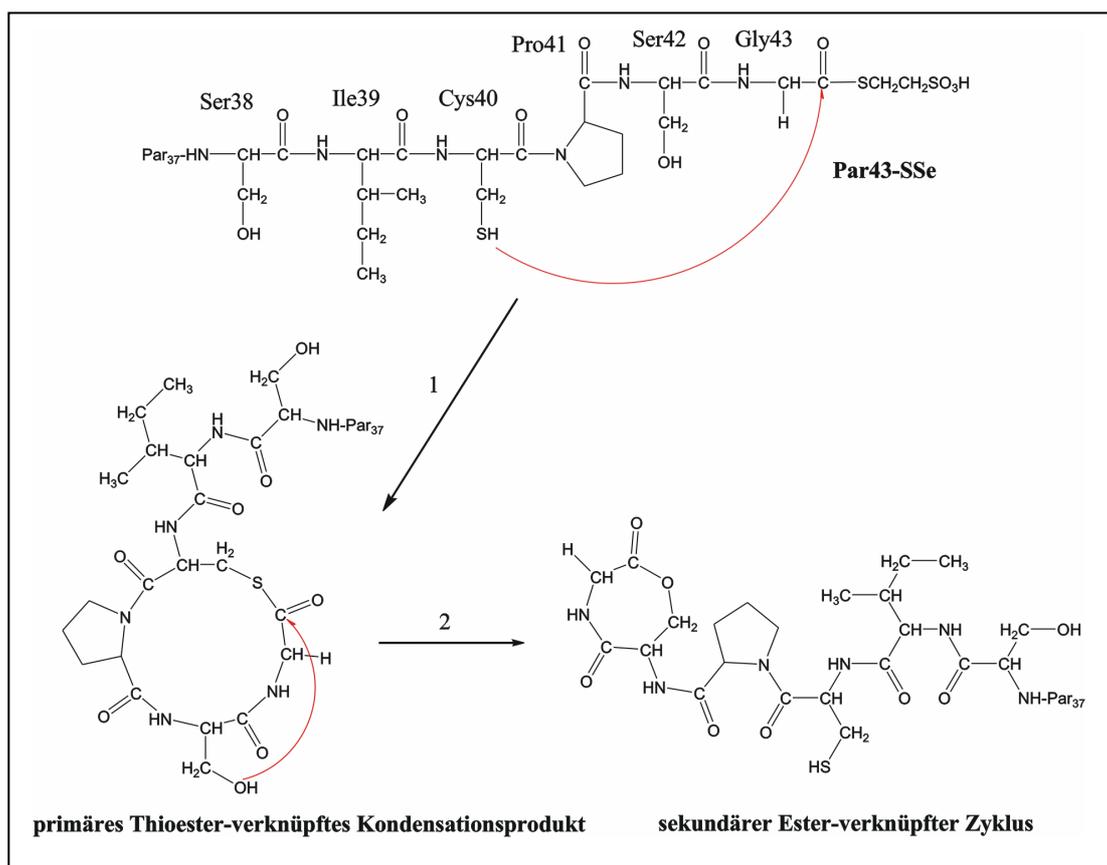


Abb. 58: Intramolekulare Kondensationsreaktionen des Par43-SSe. Die Kondensation wird durch einen nukleophilen Angriff der Cystein-Seitenkette auf das Carbonyl-C-Atom der Thioester-Funktion initiiert (1). Das primär gebildete Thioester-verknüpfte Kondensationsprodukt kann nun wiederum durch Nucleophile wie beispielsweise die Seitenketten von Ser38 oder Ser42 angegriffen werden, woraufhin ein Ester-verknüpfter Zyklus entsteht (2). Diese Reaktionen konnten erfolgreich durch Einführung der Cystein-Schutzgruppe inhibiert werden.

Eindrucksvoll konnte die neue Schutzgruppen-Strategie für interne reaktive Cysteinreste anhand der bereits in 3.3.2 beschriebenen NCL-Reaktion demonstriert werden. Während die Kondensationsreaktionen des Cys-ungeschützten Par43-SSe trotz Zugabe des *N*-terminalen Cys-Peptides CD36 nicht unterdrückt wurden und demnach praktisch kein Ligationsprodukt entstand, führte der Einsatz von Cys(NTB)-geschütztem Par43-SSe zur selektiven Reaktion zwischen dessen Thioester-Funktion und dem *N*-terminalen Cystein des CD36-Peptides. In initialen Studien wurde festgestellt, daß die NTB-Schutzgruppe entsprechend Abb. 59A durch Zugabe von Thiolen ausgetauscht wird. Handelt es sich bei dem zugesetzten Thiol um das *N*-terminale Cys-Peptid, so findet in einer ersten schnellen Reaktion der Austausch der NTB-Schutzgruppe mit diesem Reaktionspartner statt. Liegt das Cys-Peptid im Überschuß vor, so folgt diesem Schritt die eigentliche Ligationsreaktion. Im geschilderten Fall wird der reaktive Cysteinrest durch eine höhermolekulare Verbindung von 18 Aminosäureresten (Cys-CD36-Peptid) maskiert. Im Hinblick auf die Synthese von Proteinen, die im speziellen mehrere

reaktive Cysteinreste im Thioesterfragment enthalten, könnte diese Reaktion zu Löslichkeitsproblemen führen. Desweiteren muß das oft kostbare *N*-terminale Cys-Peptid im hohen Überschuß eingesetzt werden, was wiederum zur Unlöslichkeit führen kann. Zur Umgehung dieser Problemstellung wurde der Cys(NTB)-geschützte Parvulinfragment-Thioester zunächst mit MESNA inkubiert. Ein 10facher Überschuß des Thiols gegenüber dem Ester führte zur vollständigen Umsetzung von Cys(NTB)-geschütztem Par43-SSe direkt nach Thiolzugabe, wie das Verschwinden des entsprechenden Peaks **1** in Abb. 59B zeigt. Es entsteht ein neuer Peak **2**, dessen massenspektrometrische Analyse den „umschützten“ Thioester Cys(SSe)-Par43-SSe identifiziert (m/z (berechnet): 4835; m/z (bestimmt): 4835). Dieser, der eigentlichen Ligationsreaktion vorgelagerte „Umschützungs“-Schritt hat zur Folge, daß die NTB-Schutzgruppe nicht durch das *N*-terminale Cys-Peptid, sondern vielmehr durch MESNA ausgetauscht wird. Die Reaktion führt basierend auf der Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoessäure zur Gelbfärbung und kann demnach leicht bei 320 nm verfolgt werden (Peak **3**).

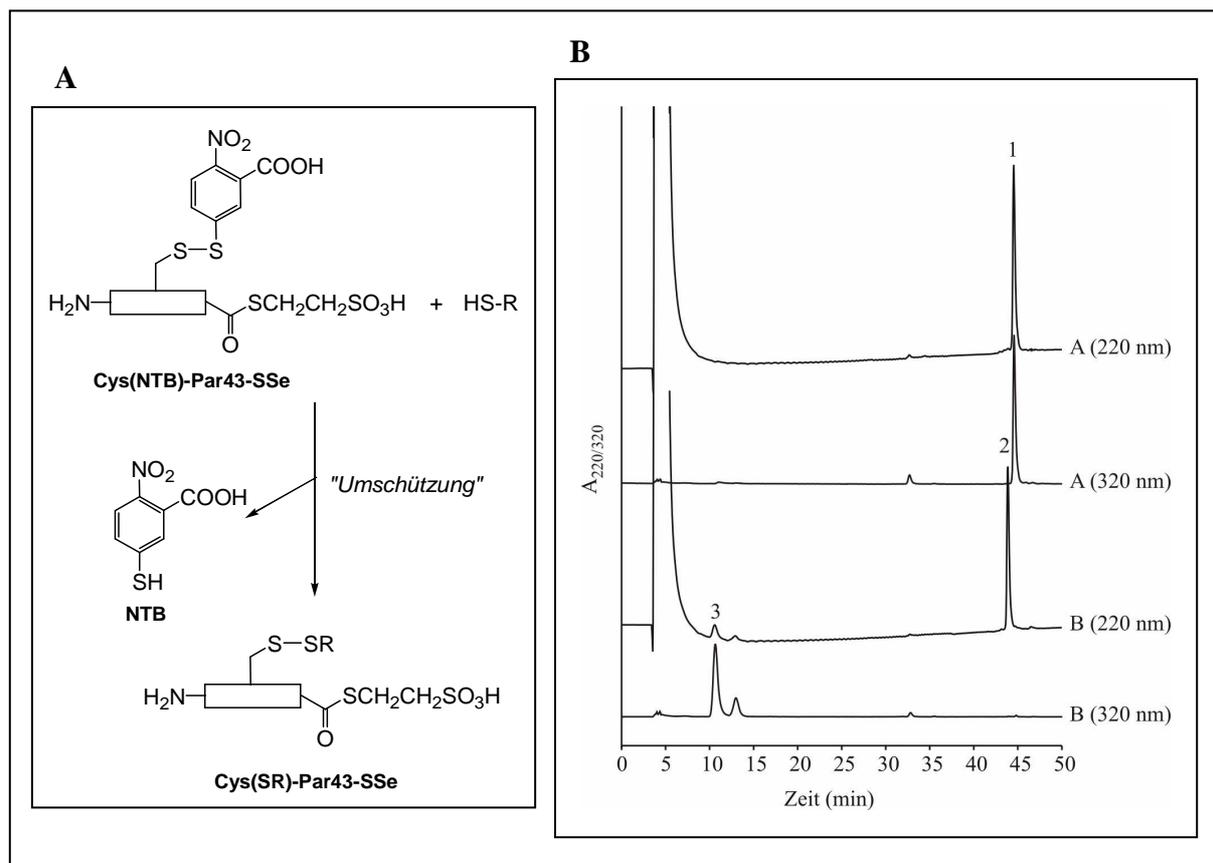


Abb. 59: Reaktionsmechanismus (A) und HPLC-chromatographische Analyse (B) des Austausches der NTB-Schutzgruppe durch Thiolzugabe. R: CD36-Modellpeptid oder CH₂CH₂SO₃H (MESNA). Peak **1**: Cys(NTB)-Par43-SSe, Peak **2**: Cys(SSe)-Par43-SSe, Peak **3**: 2-Nitro-5-thiobenzoessäure. [Cys(NTB)-Par43-SSe] = 1 mM; [MESNA] = 10 mM; 50 mM Natriumphosphat, 6 M GdmHCl, pH 7,8.

Durch Zugabe des *N*-terminalen Cys-Peptides findet dann im zweiten Schritt die eigentliche Ligationsreaktion statt (Abb. 60). Die Bildung von Kondensationsprodukten wurde nicht beobachtet, jedoch die des gewünschten Syntheseproduktes in einer Ausbeute von 90%. Für das Cys-geschützte Ligationsprodukt wurde mittels MALDI-ToF-Massen-spektrometrie eine Masse von 6674 bestimmt, die mit der berechneten von 6670 im Rahmen der Fehlergrenze übereinstimmt. Die Inkubation des Cys-geschützten Ligationsproduktes mit dem reduktiven Agens DTT oder TCEP führte zum Abspalten der Schutzgruppe. Mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie wurde die korrekte Masse des Ligationsproduktes erhalten (*m/z* (berechnet): 6531; *m/z* (bestimmt): 6532). Es konnte weiterhin festgestellt werden, daß die „neue“ Schutzgruppe (S_{Se}) nicht durch das *N*-terminale Cys-Peptid ausgetauscht wurde. Zusammenfassend konnte mit der vorgestellten Strategie unter Einführung einer Cystein-Schutzgruppe anhand der Natürlich Chemischen Ligationsreaktion die Inhibierung der unerwünschten Kondensationsreaktionen erfolgreich demonstriert werden, was letztendlich zur Produktbildung führte.

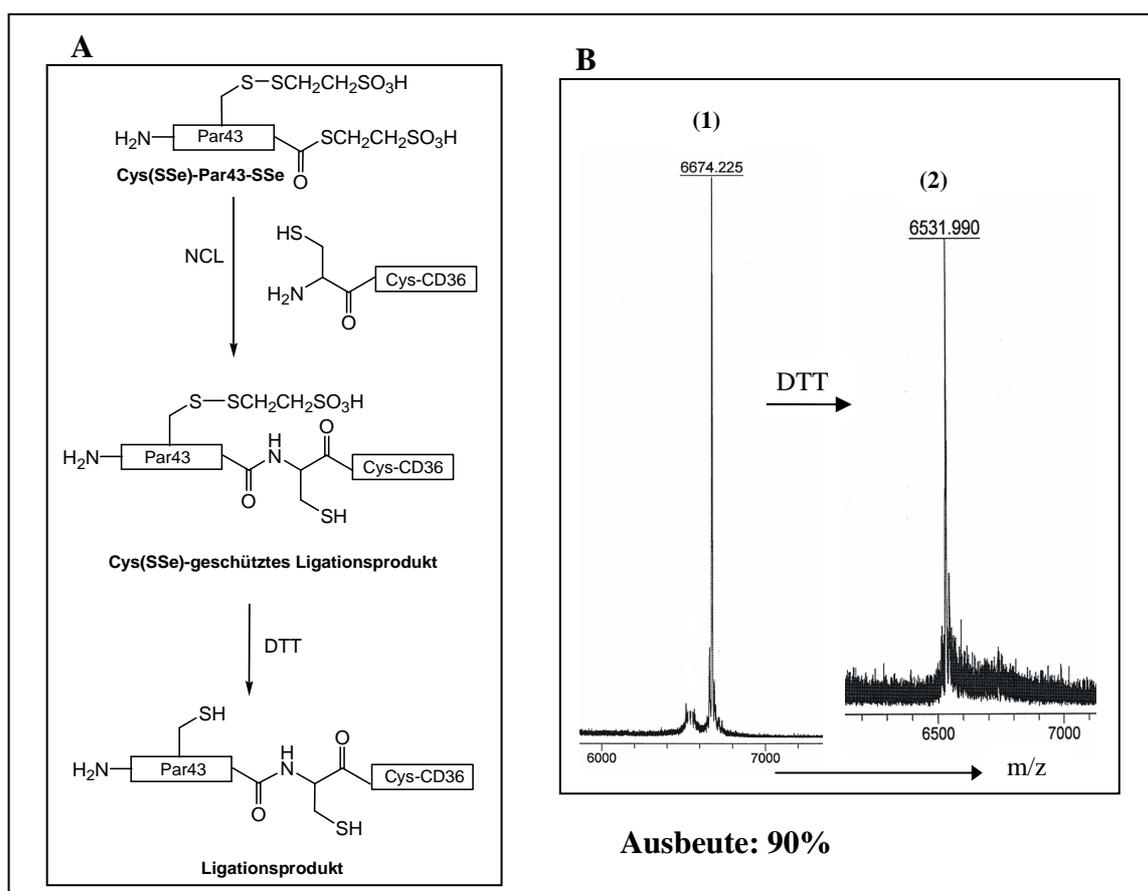


Abb. 60: Reaktionsschema der Natürlich Chemischen Ligations von Cys(S_{Se})-geschütztem Par43-S_{Se} und dem Cys-Modellpeptid CD36 (A) sowie MALDI-ToF-Massenspektren des Cys-geschützten sowie -freien Ligationsproduktes (B). 1: Cys(S_{Se})-geschütztes Par43-CD36-Ligationsprodukt (*m/z* (theoretisch): 6670; *m/z* (bestimmt): 6674); 2: Cys-freies Par43-CD36-Ligationsprodukt (*m/z* (berechnet): 6531; *m/z* (bestimmt): 6532); [Cys(NTB)-Par43-S_{Se}] = 0,15 mM; [Cys-CD36] = 1,3 mM; [MESNA] = 100 mM; 50 mM Natriumphosphat, 6 M GdmHCl, pH 7,8.

Im weiteren Verlauf sollte die entwickelte Schutzgruppenstrategie für die enzymatische Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin angewendet werden. Mit diesem Ziel wurde das Substratmimetikum Par43-SPhOH direkt mittels Intein-Strategie entsprechend 3.2.2 hergestellt und im Anschluß daran dessen Cysteinrest mit NTB blockiert. Die Synthese des fluoreszenzmarkierten Parvulin (C68A/Y90X) wurde nach dem in Abb. 61 dargestellten Schema durchgeführt, wobei der erfolgreiche Ligationsverlauf durch massenspektrometrische Analyse des Syntheseproduktes erbracht werden konnte.

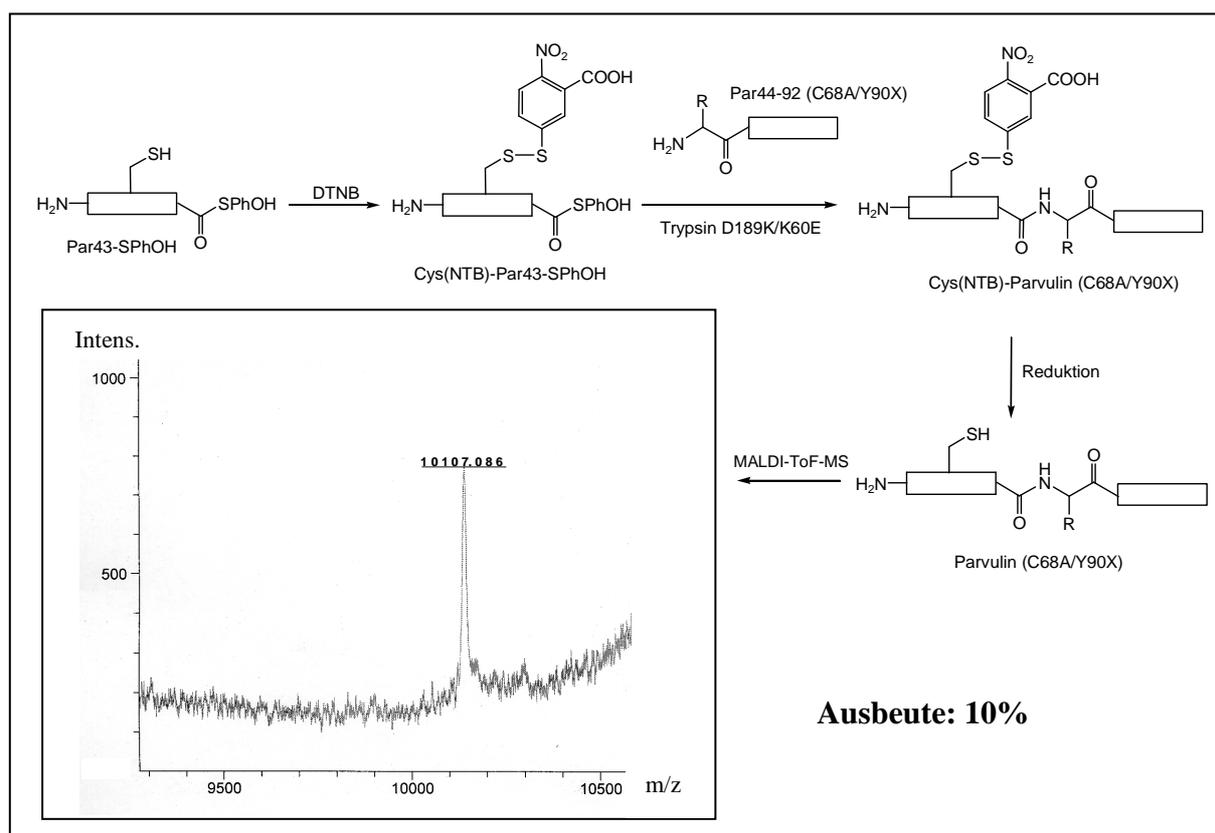


Abb. 61: Reaktionsschema der Synthese von Parvulin (C68A/Y90X) mittels Cystein-Schutzgruppe NTB. [Cys(NTB)-Par43-SPhOH] = 1 mM; [Par44-92 (C68A/Y90X)] = 1,4 mM; [Trypsin D189K/K60E] = 65 μ M; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂; 2 M GdmHCl, pH 8,0. Ligationsprodukt: m/z (berechnet): 10101, m/z (bestimmt): 10107.

Es erfolgte innerhalb von vier Stunden ein vollständiger Umsatz des eingesetzten Thioesters. Analog der durchgeführten Natürlich Chemischen Ligationsreaktion wurde ein Austausch der NTB-Schutzgruppe mit einem Thiol festgestellt. Der resultierende Cys-geschützte Thioester Cys(SPhOH)-Par43-SPhOH konnte massenspektrometrisch identifiziert werden (m/z (berechnet): 4804; m/z (bestimmt): 4804). Da ein Zusatz von 4-Mercaptophenol zum Ligationsansatz nicht erfolgte, wurde angenommen, daß diese „Umschützungsreaktion“ durch während der Ligationsreaktion freigesetztes 4-Mercaptophenol vonstatten geht. Weil der

reaktive Cysteinrest des „umschützten“ Substratmimetikums Cys(SPhOH)-Par43-SPhOH weiterhin blockiert ist, bleibt ein Einfluß auf die Syntheseausbeute aus. Interessanterweise wurde neben dieser, die Enzym-katalysierte Bildung von Ligationsprodukt unbeeinflussenden spontanen Reaktion, auch die Bildung von Kondensationsprodukten festgestellt. Dies läßt vermuten, daß es simultan zur Abspaltung der Schutzgruppe kommt. Der gebildete Cys-freie Thioester unterliegt infolgedessen seinen Kondensationsreaktionen. Diese Reaktion trat insofern unerwartet auf, als daß bei Verwendung von MESNA bei der Natürlich Chemischen Ligationsreaktion keine Schutzgruppenabspaltung stattfand. Dennoch konnte durch Anwendung der entwickelten Schutzgruppenstrategie die Syntheseausbeute an Parvulin C68A/Y90X von < 0,1% auf 10% gesteigert werden. Desweiteren wurde lediglich eine marginale spontane Produktbildung im Sinne einer spontanen Aminolyse festgestellt (< 1%). Um sicherzustellen, daß 4-Mercaptophenol tatsächlich die Schutzgruppe abspaltet, wurde Cys(NTB)-Par43-SSe mit dem Thiol versetzt. Aus Abb. 62 wird ersichtlich, daß bereits direkt nach Thiolzugabe die NTB-Abspaltung erfolgt, woraufhin Cys-freier Par43-SSe (Peak **b**) entsteht, welcher Kondensationsreaktionen (Peaks **d**) unterliegt. Ebenfalls konnte der Austausch der NTB-Schutzgruppe gegen einen 4-Hydroxythiophenylrest (Peak **a**, m/z (berechnet): 4819, m/z (bestimmt): 4819) sowie eine Umesterung zum entsprechenden 4-Hydroxyphenylthioester (Peak **c**, m/z (berechnet): 4804, m/z (bestimmt): 4803) beobachtet werden.

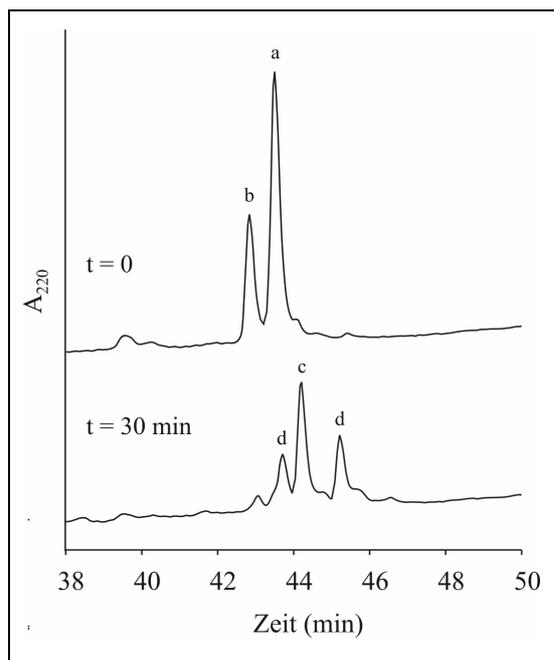


Abb. 62: Reaktionen von Cys(NTB)-Par43-SSe mit 4-Mercaptophenol. **a:** Cys(SPhOH)-Par43-SSe, **b:** Cys-freier Par43-SSe, **c:** Cys(SPhOH)-Par43-SPhOH, **d:** Kondensationsprodukte. [Cys(NTB)-Par43-SSe] = 1 mM; [4-Mercaptophenol] = 4 mM; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 2 M GdmHCl, pH 8,0.

Demzufolge führte die Gegenwart von 4-Mercaptophenol zu den in Abb. 63 dargestellten Reaktionen mit Cys(NTB)-Par43-SSe. Kommt es zu einem nukleophilen Angriff auf das S₁-Atom des Cysteinrestes, so erfolgt ein Thiol-Disulfidaustausch, woraufhin Cys(SPhOH)-Par43-SSe resultiert. Diese Reaktion beeinflusst die Ligationsreaktion nicht, da der reaktive Cysteinrest maskiert bleibt. Dagegen führt ein nukleophiler Angriff auf das S₂-Atom des NTB-Restes zur Abspaltung der Schutzgruppe, woraufhin Cys-freier Parvulinfragment-Thioester entsteht. Folgende Kondensationsreaktionen des Thioesters limitieren die Syntheseausbeute.

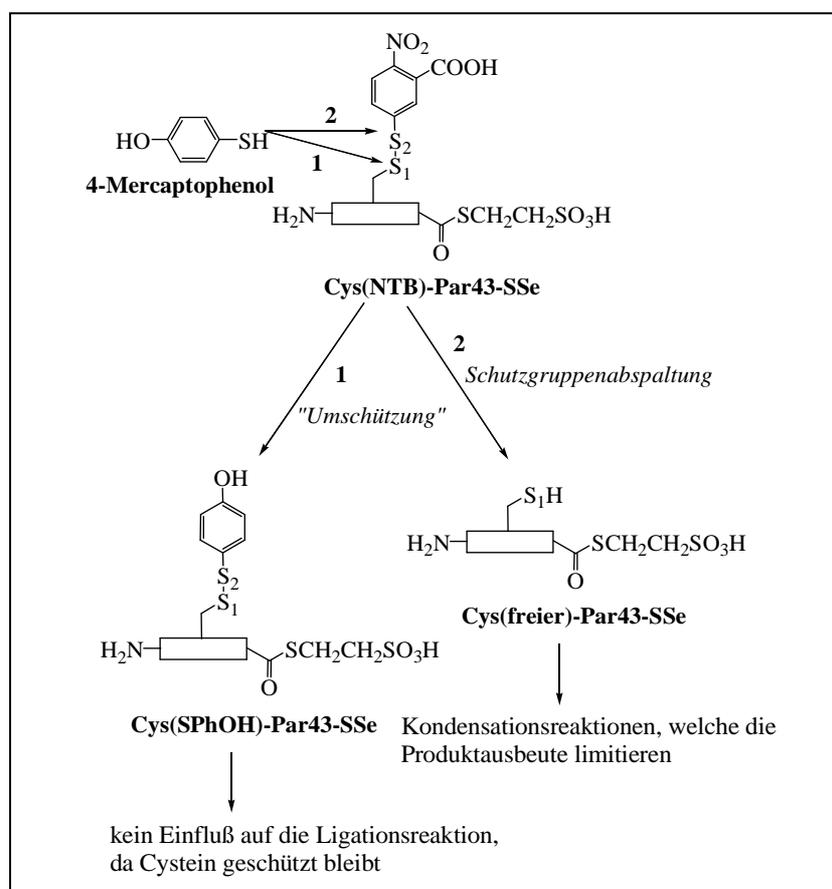


Abb. 63: Reaktionen von 4-Mercaptophenol mit Cys(NTB)-Par43-SSe.

Obwohl bei Verwendung von MESNA in der Natürlich Chemischen Ligation eine Abspaltung der NTB-Schutzgruppe nicht beobachtbar war, wurde dieses Thiol ebenfalls unter analogen Reaktionsbedingungen wie bei Einsatz von 4-Mercaptophenol mit dem Cys(NTB)-geschütztem Thioester inkubiert. Für den „umschützten“ Thioester Cys(SSe)-Par43-SSe wurden selbst nach 16 h keine Schutzgruppenabspaltung und folglich keine Kondensationsreaktionen nachgewiesen. Diese Tatsache zeigt die unterschiedlichen Reaktivitäten der verwendeten Thiole deutlich auf. Eine Erklärung hierfür liefern die pK_a-Werte der Sulfhydryl-

Gruppen von 4-Mercaptophenol und MESNA. Die SH-Gruppe des erstgenannten Thiols besitzt einen pK_a -Wert von $6,81^1$, der somit deutlich geringer als der pK_a -Wert der SH-Gruppe von MESNA mit einem Wert von $9,3^2$ ist. Bei dem verwendeten pH-Wert von 8,0 liegt demzufolge entsprechend Henderson-Hasselbalch eine wesentlich höhere Konzentration des deprotonierten Nucleophils $HO-C_6H_4-S^-$ als $H_3OS-CH_2-CH_2-S^-$ vor. Gemäß Gleichung 3.1 wurde unter den genannten Bedingungen für 4-Mercaptophenol eine effektive Nucleophilkonzentration von 3,8 mM und für MESNA von lediglich 0,12 mM berechnet, was die Abspaltung der NTB-Schutzgruppe durch 4-Mercaptophenol erklären könnte. Weiterhin stellt die Schutzgruppenabspaltung eine Reduktionsreaktion dar, da die Gegenwart von 4-Mercaptophenol zur Reduktion der Disulfidbrückenbindung zwischen dem NTB-Rest und dem Parvulinfragment-Thioester und damit zur Bindungsspaltung führt. Ein entsprechendes Oxidationsprodukt von 4-Mercaptophenol zum Disulfid SPhOH-TNB konnte jedoch bislang massenspektrometrisch noch nicht nachgewiesen werden.

Aus diesen Resultaten ergeben sich ausblickend verschiedene Strategien zur weiteren Optimierung der enzymatischen Synthese von Parvulin 10 (Abb. 64). Um einen gegenüber Kondensationsreaktionen stabilen Thioester zu erhalten, ist es beispielsweise möglich, das freigesetzte 4-Mercaptophenol abzufangen. Prinzipiell könnte man zu diesem Zweck DTNB verwenden. Außerdem scheint der Einsatz von Metallionen wie beispielsweise Hg^{2+} oder Zn^{2+} möglich, um 4-Mercaptophenol durch Metall-Thiol-Chelatbildung dem Ligationsansatz zu entziehen. Allerdings muß in jedem Fall die Erhaltung der Peptidligaseaktivität gewährleistet werden.

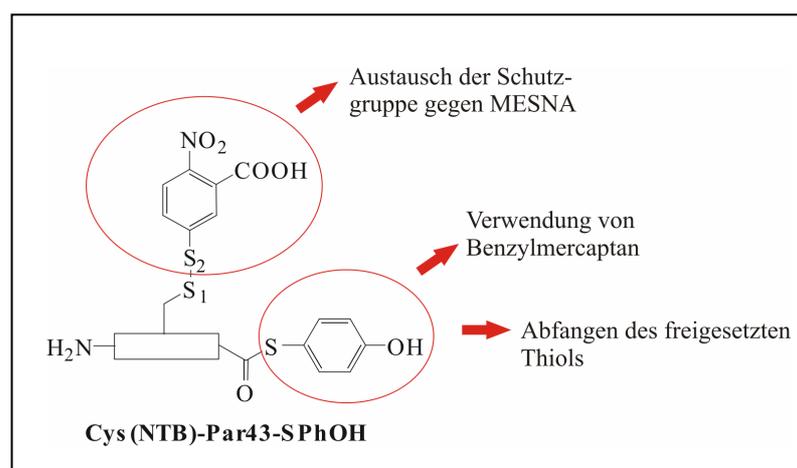


Abb. 64: Strategien zur weiteren Optimierung der enzymatischen Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10. NTB: 2-Nitro-5-thiobenzoensäure; MESNA: Mercaptoethansulfonsäure.

¹ Quelle: SciFinder, kalkulierter Wert

² Quelle: Beilstein

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die 4-Hydroxyphenylthioester-Funktion gegen eine weniger reaktive auszutauschen. Ansatzpunkte zu einer entsprechenden Auswahl sind dabei die pK_a -Werte potentieller Thiole als auch deren Redoxpotentiale, wobei gering redoxaktive Thiole vorteilhaft wären. Jedoch liegen keine Literaturdaten zu standardisierten Redoxpotentialen vor, so daß entsprechende Überlegungen nicht angestellt werden konnten und eine Auswahl gemäß den pK_a -Werten erfolgte. Desweiteren muß sich die Esterabgangsgruppe als Substratmimetikum eignen. Da die Trypsinvariante D189K/K60E eine aromatische C-terminale Ester-Funktion zur Erkennung unspezifischer Substrate benötigt, kommen der Thiophenyl- sowie Thiobenzylrest in die engere Auswahl. Aufgrund der Tatsache, daß die SH-Gruppe von Thiophenol einen pK_a -Wert von 6,61¹ besitzt und somit dem der SH-Gruppe des 4-Mercaptophenols ähnelt, wird eine ebensolche Abspaltung der Schutzgruppe bei Verwendung von Phenylthioestern vermutet. Der pK_a -Wert der Sulfhydrylgruppe von Benzylmercaptan liegt mit 9,67¹ in der Größenordnung von MESNA. Da bei einem pH-Wert von 8,0 demnach unter Ligationsbedingungen entsprechend der Henderson-Hasselbalch-Gleichung eine geringere Konzentration des deprotonierten Nukleophils $C_7H_7S^-$ als bei Verwendung von 4-Mercaptophenol vorliegt, sollte eine verminderte Abspaltung der Schutzgruppe resultieren. Erste Ergebnisse diesbezüglich zeigen, daß bei Verwendung von Benzylmercaptan tatsächlich ein stabilerer Thioester resultiert (Abb. 65). Im Gegensatz zur Inkubation von Cys(NTB)-Par43-SSe mit 4-Mercaptophenol führte die mit Benzylmercaptan nicht zur Abspaltung der Schutzgruppe direkt nach Thiolzugabe, da ausschließlich der „umschützte“ Thioester Cys(SBzl)-Par43-SSe detektiert wurde (Peak **a**, m/z (berechnet): 4817, m/z (bestimmt): 4818). Allerdings wurde ebenso in diesem Fall, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit, im weiteren Verlauf die Bildung von Kondensationsprodukten (Peaks **d**) beobachtet, die das Resultat der NTB-Abspaltung sind (Peak **b**). Außerdem erfolgte eine Umesterungsreaktion mit Benzylmercaptan zum Benzylthioester (Peak **c**, m/z (berechnet): 4799, m/z (bestimmt): 4800).

Einen weiteren Ansatzpunkt stellt der Austausch der Schutzgruppe dar. Vielversprechend scheint der Einsatz der Thiosulfonylethylgruppe (SSe), da bei Verwendung von Cys(SSe)-Par43-SSe in der Natürlich Chemischen Ligationsreaktion keine Abspaltung der Schutzgruppe stattfand. Weiterhin besteht die Möglichkeit, den reaktiven Cysteinrest mit Cystein zu schützen. Die Einführung von Cystein als Schutzgruppe erfolgte nach Rudolph et al. [1997]

¹ Quelle: SciFinder, kalkulierte Werte

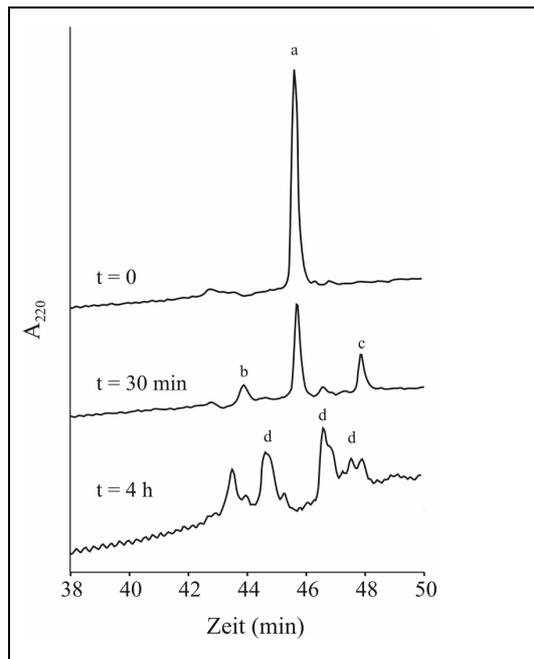


Abb. 65: Reaktionen von Cys(NTB)-Par43-SSe mit Benzylmercaptan. **a:** Cys(SBzl)-Par43-SSe, **b:** Cys-freier Par43-SSe, **c:** Cys(SBzl)-Par43-SBzl, **d:** Kondensationsprodukte. [Cys(NTB)-Par43-SSe] = 1 mM; [Benzylmercaptan] = 4 mM; 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 2 M GdmHCl, pH 8,0.

mittels eines *oxido-shuffling* Systems. Ursprünglich werden solche Systeme zur Unterstützung einer korrekten Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen während der Rückfaltung denaturierter Proteine eingesetzt. Zur Anwendung kommen dabei niedermolekulare Disulfide (RSSR) und die entsprechenden Thiole (RSH), wie beispielsweise Cystin/Cystein oder oxidiertes bzw. reduziertes Glutathion (Abb. 66).

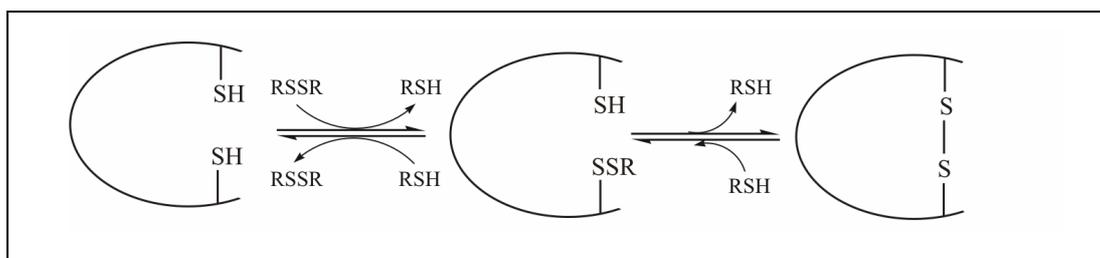


Abb. 66: Bildung einer Disulfidbrückenbindung mittels *oxido-shuffling* nach Rudolph et al. [1997]. RSSR: oxidiertes Thiol; RSH: reduziertes Thiol.

Zur Cys-Modifizierung des reaktiven Cysteinrestes 40 im Parvulinfragment-Thioester wurde Cystein im 10fachen Überschuß gegenüber Cystin eingesetzt. Um eine Oxidation des Thiols durch molekularen Sauerstoff, welche durch Metallionen katalysiert wird, zu vermeiden, wurde desweiteren EDTA zugegeben. Aufgrund der Tatsache, daß ein effizienter Thiol-Disulfid-Austausch unter basischen Bedingungen erfolgt, wurde die Reaktion bei pH 8,5 durchgeführt. Obwohl der Cys-freie Parvulinfragment-Thioester unter basischen Bedingungen schnell zyklisiert (vgl. 3.3.3), konnte eine vollständige Cys-Modifizierung direkt nach Zugabe des Thioesters zum Oxidationspuffer nachgewiesen werden (Abb. 67, Peak **a**; (m/z

(berechnet): 4814; m/z (bestimmt): 4815). Allerdings wurde ebenfalls Ligationprodukt detektiert, welches im Sinne einer Natürlich Chemischen Ligation durch Reaktion der Thioester-Funktion und Cystein resultiert. Durch Zugabe des Reduktionsmittels TCEP zum Modifizierungsansatz wurde die Cystein-Schutzgruppe abgespalten, wie das Verschwinden von Peak **a** zeigt. Stattdessen entstand Peak **b**, dessen massenspektrometrische Analyse sowohl Cys-freien Thioester (m/z (berechnet): 4695; m/z (bestimmt): 4695) als auch das geknüpfte Ligationprodukt offenbart (m/z (berechnet): 4674; m/z (bestimmt): 4675). Infolge der Schutzgruppenabspaltung durch Reduktion wurde die Bildung von Kondensationsprodukten beobachtet (Peaks **c**), welche ihren Ursprung im Cys-freien Thioester haben, der nicht ligiert wurde.

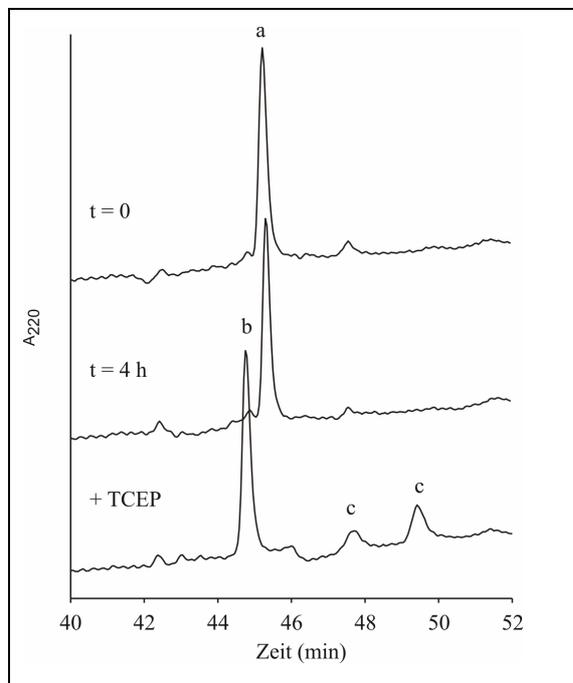


Abb. 67: Reaktionen von Cystein mit Par43-SSe mittels „oxido-shuffling“. **a:** Cys(Cys)-Par43-SSe und Cys(Cys)-Par43-Cys, **b:** Cys-freier-Par43-SSe und Par43-Cys-Ligationprodukt, **c:** Kondensationsprodukte. [Par43-SSe] = 1 mM, [Cystein] = 3 mM, [Cystin] = 0,3 mM; 0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5.

Aus diesen Resultaten läßt sich zusammenfassen, daß neben dem NTB- und SSe-Rest mit Cystein eine weitere Schutzgruppe zur temporären Maskierung des reaktiven Cysteinrestes zur Verfügung steht, die ebenfalls dem Anspruch von Selektivität und Reversibilität entspricht und somit das Methodenspektrum zur enzymatischen Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin erweitert. Allerdings muß auch in diesem Fall geprüft werden, ob die Cystein-Schutzgruppe stabil gegenüber den aromatischen Thiolen ist. Um die Thioester-Funktion während der Modifizierungsreaktion mit Cystein zu erhalten, sollte außerdem die freie NH_2 -Gruppe von Cystein beispielsweise durch einen Acetylrest blockiert werden. Weiterhin wäre der Einsatz von Glutathion, einem Tripeptid der Sequenz Glu-Cys-Gly

denkbar, da die Amino-Funktion von Cystein in diesem Fall eine Peptidbindung mit Glutaminsäure eingeht. Um weiterhin eine mögliche Aminolysereaktion des Thioesters mit der freien Aminogruppe des Tripeptides zu vermeiden, wäre auch in diesem Fall eine Blockierung zum Beispiel durch einen Acetylrest angebracht. Desweiteren ist eine Umesterungsreaktion des Thioesters mit dem Cysteinrest von Glutathion zu erwarten. Der neu entstandene Ester könnte nachfolgend durch Zugabe des entsprechenden Thiols in das Substratmimetikum überführt werden.

4 Zusammenfassung

Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine universelle Methode zur Darstellung modifizierter Proteine existiert, war es das Ziel dieser Arbeit, eine neue Strategie zu deren Synthese zu entwickeln. Unter dem Einsatz manipulierter Proteasen (Trypsin D189K/K60E und V8-Protease) in Kombination mit dem Substratmimetika-Konzept sollte die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Parvulin 10 aus *Escherichia coli* fluoreszenzmarkiert synthetisiert werden. Die experimentellen Arbeiten führten zu folgenden Ergebnissen:

Die Herstellung rekombinanter langkettiger Parvulinfragment-Substratmimetika (Par63-SCm, Par63-SSe und Par43-SPhOH) bzw. Substratmimetika-Vorläufermoleküle (Par63-SMe und Par43-SSe) wurde mittels Intein-Strategie realisiert. Dabei erwiesen sich die Vektoren pTYB1 und pTXB1 und damit beide verwendeten Inteine als geeignet, wobei aufgrund höherer Expressionsraten bei Verwendung des *Mxe* GyrA Inteins (pTXB1) entsprechend höhere Ausbeuten am Parvulinfragment-Thioester resultierten (6 mg pro Liter Bakterienkultur). Das Spektrum durch Intein-vermittelter Spaltung generierbarer Thioester konnte neben den bekannten Thiolen MESNA und Thioglykolsäure um Methylmercaptan und 4-Mercatophenol erweitert werden. Mit Ausnahme des letztgenannten wurden unabhängig vom verwendeten Intein effiziente Spaltreaktionen erhalten (95%). Der rekombinante langkettige Methylthioester Par63-SMe wurde mittels Umesterung in das Substratmimetikum Par63-SCm überführt, was zeigt, daß sich die *in situ* Umesterungsmethode nicht nur auf kürzere Peptid-Thioester beschränkt. Außerdem konnte der Sulfonylethylthioester als ein weiterer Ausgangsester identifiziert werden, da die Umesterungsreaktion mit 4-Mercatophenol erfolgreich verlief. Somit wurde die bereits für die chemische Darstellung von Thioester-Substratmimetika gezeigte sowohl direkte als auch indirekte Synthesestrategie mittels Umesterung auch auf langkettige rekombinante Substratmimetika übertragen.

Durchgeführte Ligationsreaktionen mit V8-Protease führten zu dem Ergebnis, daß der verwendete Biokatalysator proteolytische Fremdaktivität aufweist und somit nicht zur Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin eingesetzt werden kann.

Aus initialen Modellreaktionen mit der Trypsinvariante D189K/K60E ging eine generelle Akzeptanz des langkettigen *N*- und *C*-terminalen Fragmentes durch das Enzym hervor, womit erstmalig die enzymatische Umsetzung eines langkettigen Substratmimetikums durch die Protease gezeigt und eines langkettigen Acylakzeptors bestätigt werden konnte. Allerdings wurde in der mit dem *N*-terminalen Parvulinfragment Par43-SSe, respektive Par43-SPhOH, durchgeführten Modellreaktion nur eine marginale Produktausbeute erhalten, da der Thioester hauptsächlich spontanen Kondensationsreaktionen unterlag. Ein ebensolches spontanes Reaktionsverhalten des Parvulinfragment-Thioesters konnte in einer Natürlich Chemischen Ligationsreaktion festgestellt werden. Da die Kondensationsreaktionen unabhängig von der verwendeten Ligationsstrategie gleichermaßen signifikant auftraten, ist demnach für die Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10 nicht die Protease Ausbeute-limitierender Faktor.

Die Untersuchung der Kondensationsreaktionen führte zu folgenden Ergebnissen:

Die Kondensationsreaktionen verliefen generell unabhängig vom verwendeten Parvulinfragment (Par43, Par63) sowie der verwendeten Thioester-Funktion (SSe, SPhOH, SME, SCm) und abhängig vom pH-Wert, wobei mit steigendem pH-Wert zunehmende Zyklisierungsraten resultierten. Demzufolge bestand kein signifikanter Einfluß der Kondensationsreaktionen während der Synthese der Substratmimetika, da unter neutralen pH-Bedingungen gearbeitet wurde. Außerdem wurde eine Abhängigkeit der Zyklisierungsrate von der Reaktivität der Thioester-Funktion festgestellt.

Eingehende Untersuchungen legten eine initiale Beteiligung des Cysteinrestes 40 an den Kondensationsreaktionen des Thioesters nahe. Diese Vermutung konnte durch die temporäre Blockierung des Restes mit 2-Nitro-5-thiobenzoessäure bestätigt und somit der Ursprung der Kondensationsreaktionen aufgeklärt werden. Alle bezüglich der Untersuchung der Kondensationsreaktionen durchgeführten Experimente führten in ihrer Gesamtheit zu folgendem Reaktionsmechanismus. Es entsteht aufgrund des nukleophilen Angriffes der Cystein-Seitenkette auf das Carbonylkohlenstoffatom der Thioester-Funktion in einer schnellen Reaktion ein primäres Thioester-verknüpftes Kondensationsprodukt. In langsamer

verlaufenden sekundären Folgereaktionen kann dieses wiederum durch Nukleophile, wie beispielsweise den Seitenketten von Ser38 oder Ser40, angegriffen werden, woraus weitere Kondensationsprodukte resultieren.

Die Synthese von fluoreszenzmarkiertem Parvulin unter Katalyse von Trypsin D189K/K60E erfolgte aufgrund der Kondensationsreaktionen des Parvulinfragment-Thioesters mittels zweier Strategien. Eine kinetische Kontrolle der Kondensationsreaktionen gelang trotz einer vorgenommenen Erhöhung der Substrat- und Enzymkonzentration nicht wie gewünscht. Dennoch konnte eine erfolgreiche Knüpfung der Parvulinfragmente katalysiert durch Trypsin D189K/K60E nachgewiesen und somit erstmals die Substratmimetika-vermittelte Protease-katalysierte Synthese eines fluoreszenzmarkierten katalytisch aktiven Proteins beispielhaft demonstriert werden. Die Ausbeute an enzymatisch entstandenem Syntheseprodukt betrug jedoch weniger als 0,1%. Desweiteren wurde durch Inkubation der Parvulinfragmente katalytisch aktives Parvulin spontan erzeugt, was die Komplementierung der Proteinfragmente zum Gesamtprotein ausdrückt. Experimentelle Befunde, im speziellen eine spontane Produktbildung bei Verwendung der Säure anstelle des Thioesters sowie die Tatsache, daß keine Abhängigkeit der spontanen Parvulinsynthese von der verwendeten Thioester-Funktion besteht, ließen den Schluß zu, daß eine Assoziationsreaktion wesentlich zur spontanen Parvulinsynthese beiträgt. Weiterhin wird aufgrund der verminderten Ausbeute an katalytisch aktivem Produkt in Gegenwart vollständig denaturierter Proteinfragmente ein Konformations-getriebener Prozeß vermutet.

Im Gegensatz zur Synthese von Parvulin unter kinetischer Kontrolle der Kondensationsreaktionen verlief die unter temporärem Schutz der Cystein-Thiol-Funktion erfolgreicher. Obwohl die verwendete NTB-Schutzgruppe während der Ligationsreaktion durch freigesetztes 4-Mercaptophenol abgespalten wurde, konnte mithilfe der entwickelten Schutzgruppenstrategie die Ausbeute an fluoreszenzmarkiertem Parvulin von $< 0,1\%$ auf 10% gesteigert werden. Ebenso führte die durchgeführte Natürlich Chemische Ligationsreaktion unter temporärem Schutz der Cystein-Thiol-Funktion zur Bildung des Syntheseproduktes in einer Ausbeute von 90% . Die Unterschiede in den Ausbeuten der entwickelten enzymatischen und Natürlich Chemischen Ligationsreaktion sind der Tatsache geschuldet, daß 4-Mercaptophenol im Gegensatz zu MESNA nicht nur zu einer „Umschützung“, sondern auch zur

Abspaltung der Schutzgruppe führt. Der resultierende Cys-freie Parvulinfragment-Thioester unterliegt im weiteren Verlauf seinen Kondensationsreaktionen, was wiederum die Ausbeute an fluoreszenzmarkiertem Parvulin 10 limitiert.

Zusammenfassend stellt die vorliegende Arbeit eine neue Strategie zur Synthese modifizierter Proteine unter dem Einsatz der Trypsinvariante D189K/K60E in Kombination mit dem Substratmimetika-Konzept vor. Die noch nicht zufriedenstellende Ausbeute an fluoreszenzmarkiertem Protein ist dabei nicht der entwickelten Methode geschuldet, sondern den spontan verlaufenden Kondensationsreaktionen des Parvulinfragment-Thioesters. Daher sollten in weiterführenden Studien Optimierungen hinsichtlich der Steigerung der Syntheseausbeute durchgeführt werden. Das Abfangen des reaktiven Thiols sowie der Austausch der Schutzgruppe bzw. der Thioester-Funktion könnten im Hinblick darauf geeignete Ansatzpunkte darstellen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien

Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad „p. a.“ und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Agar	AppliChem
Agarose	Serva, Biozym
Ampicillin	AppliChem
APS	Roth
Blot-Papier	Schleier & Schuell
Bromphenolblau	Serva
Centriprep YM-3 (3,000 MWCO)	Amicon Bioseparations/ Millipore
Centriprep YM-10 (10,000 MWCO)	Amicon Bioseparations/ Millipore
Cys-CD36-Peptid	Bachem
DNA-Basen	Sigma-Aldrich
DTNB	Fluka
Ethidiumbromid	Roth
Filter (steril)	Roth
GdmHCl	Roth
Harnstoff	Fluka
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company
Hefestickstoff	Sigma-Aldrich
Hybond TM -N ⁺ -Membran	Amersham
Hyperfilm ECL	Amersham
IPTG	AppliChem
Ladepuffer DNA	AppliChem
Mineralöl	Biometra
Pepton	Becton, Dickinson and Company
PMSF	Fluka
Rotiphorese Gel 30	Roth
Rotiphorese Gel B	Roth
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassete 10.000	Pierce
Spectra/ Por CE Membrane 1,000	Spectrum

TEMED	Roth
Thiole	Fluka
VIVASPIN 3,000 MWCO	Vivascience
ZipTip _{C4} -Pipettenspitzen	Amicon Bioseparations/ Millipore

Enzyme und Antikörper

Anti-IgG Kaninchen Antikörper (Peroxidase-Konjugat)	Sigma-Aldrich
Chymotrypsin	Sigma-Aldrich
Enterokinase	Biozyme Laboratories
PfuTurbo-DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	NEB
T4-DNA-Ligase	Fermentas
V8-Protease	Fluka

Das Anti-Par10-Antiserum wurde von der Firma pab production Herbertshausen (Deutschland) hergestellt.

Kits und Standards

Kits

Plasmidisolierung	Quiagen, Invitrogen, Stratagene
DNA-Extraktion	Stratagene, Biozym
Transformation von Hefe	ZYMO Research

Standards

DNA

174 DNA-Hae III	NEB
100 bp DNA Leiter	NEB
1 kb DNA Leiter	NEB

Protein

Proteintestmischung 4/5	Serva
10 kD Protein Marker	GIBCO BRL

Molecular Weight Marker for Proteins (MW groß) FLUKA

Protein Molecular Weight Marker (MW klein) Fermentas

PageRuler Fermentas

Für die Western Blot Experimente wurden die *wide range protein standards* MultiMark und SeeBlue von Invitrogen eingesetzt.

Verwendete Bakterien- und Hefestämme

Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden der Stammsammlung entnommen oder von der Firma Stratagene bzw. NEB bezogen. Der Hefestamm wurde freundlicherweise von Frau Prof. L. Hedstrom zur Verfügung gestellt.

***E. coli* Stämme: Genotyp**

BL21 (DE3) *hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)*
[Studier & Moffatt, 1986]

DH5α *supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi relA1*
[Hanahan, 1983]

XL1 Blue *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F⁻[proAB⁺lacI^qlacZΔM15 Tn10 (tet^r)]*
[Bullock et al., 1987]

XL2 Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F['] proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]*
[Bullock et al., 1987]

ER2566 *FλfhuA2 [Ion] omp T lacZ::T7 gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10R(mrc-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]*
[IMPACTTM-CN, 2004]

***S. cerevisiae* Stamm Genotyp**

DLM101α *Mat a, leu2-3, -112 his 2, 3-11, -15 can1, ura3Δ, pep4, [cir⁰], DM23*

Plasmide

pTYB1	<i>Sce</i> VMA1 Intein-CBD	NEB
pTXB1	<i>Mxe</i> GyrA Intein-CBD	NEB
pYT D189K/K60E	Trypsin D189K/K60E	[Rall, 2004]
pSEP612	<i>E. coli</i> Parvulin 10	[Schelbert, 1998]

Oligodesoxyribonukleotide

Die Synthese der Oligodesoxyribonukleotide für die Polymerasekettenreaktionen erfolgte durch die Firma MWG (<http://www.mwg-biotech.com>).

PCR-Primer

Par63_1	5'-GGTGGT <u>CATATGG</u> CAAAAACAGCAGCAGCACTGC-3'
Par63_2	5'-GGTGGTTGCTCTT <u>CCGC</u> ATTTATCGAACGCCGGAAC-3'
Par43_1	5'-GGTGGT <u>CATATGG</u> CAAAAACAGCAGCAGCACTGC-3'
Par43_2	5'-GGTGGTTGCTCTT <u>CCGC</u> AGCCTGATGGGCAAATGGAGTG-3'

Die unterstrichenen Sequenzen kennzeichnen die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *SapI*.

Sequenzierprimer

T7 Universal Primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Medien***Medien zur Kultivierung von E. coli***

LB-Medium	10 g/l	Pepton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl

Zur Herstellung von Kulturplatten wurde dem Medium 10 g/l Agar zugesetzt. Nach Abkühlen des Mediums wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Medien zur Kultivierung von Hefe

Leucin-Defizienzmedium	6,6	g/l	Hefestickstoff
	1,3	g/l	Defizienzmedium
	400	ml/l	Glucose (20%)*
	10	ml/l	Uracil (240 mg/100 ml)*
Defizienzmedium	0,37	g	Adenin
	1	g	Histidin HCl
	1	g	Arginin HCl
	1	g	Methionin
	1,5	g	Tyrosin
	1,5	g	Isoleucin
	1,5	g	Lysin HCl
	2,5	g	Phenylalanin
	5	g	Asparaginsäure
	7,5	g	Valin
	10	g	Threonin
18,75	g	Serin	
YPD-Medium	5	g/l	Hefeextrakt
	10	g/l	Pepton
	60	ml/l	Glucose (20%)*
Kulturplatten	6,6	g/l	Hefestickstoff
	1,3	g/l	Defizienzmedium
	20	g/l	Agar
	80	g/l	Glucose*
	10	ml/l	Leucin (360 mg/100 ml)*
	10	ml/l	Uracil (240 mg/100 ml)*

* erst nach dem Autoklavieren zugegeben

Kultivierung von E. coli und S. cerevisiae

Die Kultivierung erfolgte in den jeweiligen sterilen Medien bei 37 °C für *E. coli* und 30 °C für Hefe. Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden zu 920 µl einer Bakterien- bzw. Hefekultur 80 µl steriles Glycerol gegeben und bis zur Homogenität gemischt. Nach Gefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung der Proben bei -80 °C. Zur Herstellung von *E. coli* Übernachtskulturen wurden 5-30 ml LB_{Amp}-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie bzw. Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Zur Herstellung von *S. cerevisiae* Vorkulturen wurden 20 ml Leucin-Defizienzmedium mit einer Hefekolonie bzw. Glycerinkultur angeimpft und für 3-4 Tage bei 30 °C und 150 rpm inkubiert.

5.2 Untersuchungen zur Expression und Löslichkeit der Intein-Fusionsproteine

Für einen Überexpressionstest wurden 5-20 ml LB_{Amp}-Medium mit 0,5-2,0 ml einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 erfolgte die Induktion mit 0,1-1,0 mM IPTG bei 25, 30 und 37 °C. Im Stundenrhythmus wurde jeweils 1 ml der induzierten Bakterienkultur entnommen und für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und jeweils 10-15 µl der Probe zur Beladung von SDS-Proteingelen verwendet, welche Coomassie gefärbt wurden. Als Referenz dienten nicht-induzierte Zellen.

Zur Feststellung der Lokalisierung der Intein-Fusionsproteine wurden Zellen von 1,5 ml induzierter Bakterienkultur in 300 µl 50 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH 7,0 resuspendiert und mittels Ultraschall an einem Bioblock 72442, Scientific der Firma Vibra Cell aufgeschlossen (4 min, 2-Sekunden-Pulse, 1-2 Watt). Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurden lösliche Proteine im Überstand erhalten, während sich unlösliche Proteine im Pellet befanden. Das Pellet wurde mit 200 µl einer gesättigten Harnstofflösung versetzt und resuspendiert. Jeweils 15 µl Probe dienten zur Analyse mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung.

5.3 Bestimmung der Spalteffizienz von Thiolen

Die Effizienz verschiedener Thiole, ein Intein-Fusionsprotein zu spalten, geht aus dem direkten Vergleich der Proteinbanden für gespaltenes und nicht-gespaltenes Intein-Fusionsprotein einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE hervor und wurde densitometrisch mit Hilfe des Programmes AIDA bestimmt.

5.4 Präparation kompetenter *E. coli* Zellen

TYM	20 g/l	Pepton	TfbI	2,9 g/l	KOAc
	5 g/l	Hefeextrakt		9,9 g/l	MnCl ₂
	5,8 g/l	NaCl		7,4 g/l	KCl
	2,5 g/l	MgSO ₄		1,5 g/l	CaCl ₂
				150 ml/l	Glycerol

TfbII	200 ml/l	MOPS (50 mM, pH 7,0)
	11 g/l	CaCl ₂
	0,75 g/l	KCl
	150 ml/l	Glycerol

Eine volle Impföse Zellen wurde in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 5 ml TYM mit 50 µl der Übernachtskultur angeimpft und für 2 Stunden bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Davon wurden 5 ml zu 100 ml frischem LB-Medium transferiert und bei 37 °C, 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert.

Die folgenden Schritte erfolgten auf Eis:

Die Kultur wurde zentrifugiert (2500 rpm, 5 min), das Pellet in 20 ml TfbI resuspendiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgten die Resuspendierung des Pellets in 2 ml TfbII, Aliquotierung sowie Lagerung bei -80 °C.

5.5 Transformation von *E. coli* und *S. cerevisiae*

Nach Auftauen kompetenter *E. coli* Zellen auf Eis wurde 1-10 ng Plasmid zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 Minute erfolgte wiederum eine Inkubation auf Eis (2 min). Es wurden 300 µl LB-Medium zugesetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. 100 µl der Kultur wurden auf einer LB_{Amp}-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Transformation von Hefe erfolgte mit dem EZ Transformationskit. Dazu wurden kompetente Hefezellen auf Eis aufgetaut und 0,2 bis 1 µg Plasmid sowie 500 µl EZ3 Lösung zugegeben. Es wurde für 45 Minuten bei 30 °C inkubiert und der Ansatz dabei mehrmals geschwenkt. 50 bis 150 µl transformierter Hefezellen dienen zur Selektion auf Uracil-defizienten Platten. Nach 3-4 Tagen wurden Transformanten auf Leucin-defizienten Platten

ausgestrichen. Nach weiteren 3-4 Tagen wurde eine Kolonie in 20 ml Leucin-defizientes Medium überführt und mit dieser Vorkultur die Trypsinogenexpression gestartet.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein Kit von Quiagen, Stratagene oder Invitrogen verwendet, um die Plasmid-DNA aus einer 5 ml Übernachtskultur zu isolieren.

5.6 Reinigung von DNA

Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation erfolgten nach Sambrook et al. [1989]. Die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde mit einem Kit von Stratagene oder Biozym durchgeführt.

5.7 Enzymatische Modifikation von DNA

Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Spaltungen mit den Restriktionsendonukleasen *SapI* und *NdeI* erfolgten nach den Empfehlungen des Herstellers, wobei die DNA (0,1-5 µg) für gewöhnlich mit 3-20 U Enzym in 1xReaktionspuffer für 2-3 h bei 37 °C inkubiert wurde.

Ligation

Die Insertion eines DNA-Fragmentes in einen Vektor erfolgte, nachdem sowohl der Vektor als auch die DNA mit Restriktionsenzymen gespalten wurden. Zur Ligation dienten 20-40 ng gespaltener Vektor und der 3-10fache Überschuß des geschnittenen Fragmentes. Die Reaktion wurde mit 1U T4-DNA-Ligase in 1xLigationspuffer über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Ein Teil des Ligationsansatzes diente zur Transformation von *E. coli* Zellen.

Für die Sequenzierung wurden 1-2 µg DNA benötigt. Dazu wurde die Probe mittels Ethanolpräzipitation gereinigt und aufkonzentriert. Die Sequenzierungsreaktionen erfolgten durch die Firma MWG.

5.8 Polymerasekettenreaktion

Die Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte erfolgte mittels der PCR-Methode an einem T3 Thermocycler der Firma Biometra. Gleichzeitig wurden durch den Einsatz spezifischer

Primer neue Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der DNA-Fragmente in entsprechende Vektoren eingeführt. Ein PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

1	µl	Templat-DNA (50-100 ng)
1	µl	Primer I (1 µg/µl)
1	µl	Primer II (1 µg/µl)
2	µl	dNTP-Mix (2,5 mM)
5	µl	10xPfu-Puffer
39	µl	steriles, destilliertes Wasser
1	µl	PfuTurbo-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

Der Ansatz wurde mit 30 µl Mineralöl überschichtet und die Reaktion nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1.	1 min	95 °C	Denaturierung der Templat-DNA	1 Zyklus
2.	30 s	95 °C	Denaturierung der Templat-DNA	
	1 min	55-60 °C	Annealen der Primer	
	20 s	68 °C	Polymerisationsschritt	25-30 Zyklen
3.	5 min	68 °C	Polymerisationsschritt	1 Zyklus

Die Annealing-Temperatur lag 5-15 °C unter der Schmelztemperatur der Primer.

5.9 Agarose-Gelelektrophorese

10xTAE Puffer	0,4 M Tris-Acetat
	0,01 M EDTA
	pH 8,5

Je nach DNA-Größe fanden DNA-Gele zwischen 0,8 und 3% Anwendung, wobei die entsprechende Menge an Agarose in 30 ml 1xTAE Puffer unter Erhitzen gelöst wurde. Durch Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid (10 µg/ml) wurde die spätere Detektion der DNA unter UV-Licht realisiert. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch bei max. 120 V aufgetrennt. Die Analyse der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht, wobei das Ergebnis fotografisch dokumentiert wurde. Die DNA ausgeschnittener Banden wurde zur weiteren Verwendung aus dem Gel aufgereinigt.

5.10 Synthese und Reinigung von Proteinen bzw. Proteinfragmenten

5.10.1 Intein-vermittelte Synthese und Reinigung rekombinanter Parvulinfragment-Thioester

Zur Überexpression der rekombinanten Intein-Fusionsproteine in *E. coli* wurde 1 Liter LB-Medium mit 20-30 ml einer Übernachtskultur unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion mittels IPTG (0,1 mM) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5. Nach 16stündiger Inkubation bei 16 °C wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 6000 rpm, 4 °C) und anschließend sofort für die Proteinreinigung verwendet oder bei -20 °C gelagert. Es konnten 5-10 g Zellen pro Liter Bakterienkultur geerntet werden.

Zunächst erfolgte die Synthese rekombinanter Parvulinfragment-Thioester nach einem vom Hersteller vorgeschlagenen Syntheseprotokoll bei pH 6,5. Zur Aufschließung der Zellen wurde eine French Press Cell Press, SLM AMINCO der Firma SLM Instruments verwendet.

Syntheseprotokoll nach NEB

Das Pellet von 200 ml induzierten *E. coli* Zellen wurde mittels French Press (20000 psi) aufgeschlossen und der nach Zentrifugation erhaltene Rohextrakt zur Beladung einer mit 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH 6,5 äquilibrierten Chitinsäule eingesetzt. Die Thiol-induzierte Spaltung der Intein-Fusionsproteine erfolgte mit 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0,1 M Thiol, pH 6,5 für 16 Stunden bei 4 °C. Zur Elution dienten folgende Puffer: 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH 6,5 bzw. 20 mM Natriumphosphat, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0,1% Triton, pH 6,5. Anschließend wurden 300 µl *chitin beads* entnommen, mit 100 µl Probenpuffer versetzt und für 2 Minuten bei 95 °C gekocht. Diese Säulen-Fraktion und die Elutions-Fraktionen wurden zur Analyse mittels Western Blot eingesetzt.

Optimiertes Syntheseprotokoll

Säulenpuffer	50 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH 7,0
Waschpuffer	50 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH 7,0
Spaltpuffer	50 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 200 mM Thiol, 1 mM TCEP, pH 7,0

Elutionspuffer 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 M Harnstoff, 1 mM TCEP, pH 7,0

Regenerierung 0,3 M NaOH

Es fand der Phosphatpuffer nach Sørensen Anwendung [Kleber et al., 1997]. Das Reduktionsmittel TCEP wurde zur Vermeidung einer möglichen Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen zugesetzt [Burns et al., 1991]. Sowohl Harnstoff als auch Thiole wurden dem jeweiligen Puffer unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

E. coli Zellen von 2-6 Liter induzierter Bakterienkultur wurden nach Zugabe von 20 μM PMSF mittels French Press (20000 psi) aufgeschlossen und der nach Ultrazentrifugation für 45 Minuten bei 35000 rpm und 4 °C erhaltene Überstand auf eine mit Säulenpuffer äquilibrierte Chitinsäule aufgegeben. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Waschpuffer eluiert. Die Spaltung der Intein-Fusionsproteine erfolgte für 48 Stunden bei 4 °C mittels Spaltpuffer. Zur Elution wurde ein harnstoffhaltiger Puffer verwendet. Die Proteinenthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE bzw. Tricin-SDS-PAGE identifiziert. Proteinfragment-Thioester, die durch Spaltung der Intein-Fusionsproteine Par43YB und Par63YB resultierten, bedurften keines weiteren Reinigungsschrittes. Die Lagerung erfolgte im lyophilisierten Zustand. Zur Entfernung des Thiols diente eine Dialyse gegen den entsprechenden Reaktionspuffer der Ligationsreaktion. Allerdings wurde die Dialyse unter Berücksichtigung der Stabilität von Thioestern bei pH 7,0 statt pH 8,0 durchgeführt. Spaltreaktionen mit 4-Mercaptophenol wurden in analoger Weise durchgeführt. Allerdings erfolgte der Einsatz von nur 10 mM Thiol und die Zugabe von 15 mM anstatt 1 mM TCEP.

Optimiertes Reinigungsprotokoll

Für die Parvulinfragment-Thioester, die durch Spaltung der Intein-Fusionsproteine Par43XB und Par63XB resultierten, schloß sich ein weiterer Reinigungsschritt an. Dieser erfolgte mittels Perfusionschromatographie an einer Biocad 700E Perfusion Chromatography Workstation der Firma Perseptive Biosystems unter Verwendung einer Reversed Phase Säule R2 (4 x 100 mm, Perseptive Biosystems) und Nutzung folgender Laufmittel:

A: 95% destilliertes Wasser/4,9% ACN/0,1% TFA

B: 95% ACN/ 4,9% destilliertes Wasser/ 0,1% TFA.

Die Elution der gebundenen Proteinfragment-Thioester wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: Start mit 100% A, in 2 Minuten auf 10% B, in 6 Minuten auf 60% B, in 7 Minuten auf 80% B. Bei diesem Reinigungsschritt wurde gleichzeitig das Thiol entfernt. Die Proteinfragment-Thioester wurden lyophilisiert und unmittelbar vor den Ligationsreaktionen im Reaktionspuffer bzw. DMF angelöst (vgl. 5.12).

Umesterungsreaktionen rekombinanter Ausgangsester zur Darstellung von Substratmimetika erfolgten in 50 mM Natrium-Phosphat, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 7,0 mit 0,1 mM Par63-SMe und 100 mM Thioglykolsäure bzw. in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 7,0 mit 0,1 mM Par43-SSe bzw. Par43-SMe mit 4 mM 4-Mercaptophenol.

5.10.2 Chemische Synthese und Reinigung C-terminaler Peptide (Dr. G. Jahreis)

Die Synthese der Parvulinfragmente Par44-92 (C68A/Y90X) (Peptid **1**) und Par64-92 (C68A/Q80B) (Peptid **2**) sowie die des 16mer Modellpeptides (Peptid **3**) erfolgte durch Dr. G. Jahreis.

Die Peptide wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese (SPPS) am Synthesizer Syro II (MultiSynTech GmbH, Witten, Deutschland) unter Verwendung der Fmoc-Strategie mit 0,15 mmol Fmoc-Asn(Trt)-Wang Harz (Peptide **1**, **2**) und Fmoc-Tyr(tBu)-Wang Harz (Peptid **3**) der Firma Novachem (Läufelfingen, Schweiz) hergestellt. Es kamen Fmoc-Aminosäuren der Firma ACT (Louisville, KY, USA) zur Anwendung. Der Fmoc-geschützte dansylierte Aminosäurebaustein Fmoc-Gln(Dns)-OH wurde von P. Ozdowy synthetisiert.

Synthese von Fmoc-Gln(Dns)-OH (P. Ozdowy)

Die Herstellung von Dansyl-ethylendiamin erfolgte nach Ren et al. [1999] mit einem Äquivalent Dansylchlorid und fünf Äquivalenten Diethylamin in THF. Fmoc-Gln(Dns)-OH wurde durch Kupplung von 1,5 Äquivalenten Dansyl-ethylendiamin, 1 Äquivalent Fmoc-Glu-OtBu, 1 Äquivalent HATU und 2 Äquivalenten DIEA in DMF hergestellt. Die Abspaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe erfolgte nach Standardprotokoll acidolytisch.

Synthese der Peptide 1-3

Ausgehend von den vorbeladenen Harzen wurden Kupplungen mit 4 Äquivalenten an Fmoc-Aminosäurederivat, PyBOP und 8 Äquivalenten *N*-Methylmorpholin in DMF durchgeführt.

Piperidin/DMF (1:4) diente zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Die simultane Abspaltung der Peptide **1** und **3** vom Harz sowohl die der Schutzgruppen erfolgte mit TFA/Wasser/TIS (85:10:5) für 12 Stunden bei Raumtemperatur. Die Abspaltung des Peptides **2** vom Harz und die Deblockierung aller funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten erfolgte mit einem TFA/DCM/Wasser-Gemisch (70:27:3). Die Peptide wurden an einem präparativen HPLC-System der Firma Sykam mit UV/VIS Einzelwellenlängendetektor von Linear mit einer C8 Säule (SP 250/10 Nucleosil 100-7, Machery Nagel, Düren, Deutschland) mittels eines Gradienten gereinigt. Als Elutionsmittel kamen Wasser/ACN-Gemische mit 0,1% TFA zum Einsatz. Die Identität der Peptide wurde mittels ESI- und MALDI-ToF-Massenspektrometrie überprüft. Die analytischen HPLC-Läufe erfolgten an einem analytischen HPLC-System der Firma Sykam mit schnellscannendem Multiwellenlängen Detektor von Linear über einen 30 minütigen Wasser/Acetonitril-Gradienten (5-100%) mit einer C8-Säule (LiChrospher 100, 125 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) und bei einer Wellenlänge von 220 nm.

Peptid 1

Par44-92 (C68A/Y90X)

H-Lys-Arg-Gly-Gly-Asp-Leu-Gly-Glu-Phe-Arg-Gln-Gly-Gln-Met-Val-Pro-Ala-Phe-Asp-Lys-Val-Val-Phe-Ser-**Ala**-Pro-Val-Leu-Glu-Pro-Thr-Gly-Pro-Leu-His-Thr-Gln-Phe-Gly-Tyr-His-Ile-Ile-Lys-Val-Leu-**Nal**-Arg-Asn-OH

m/z (berechnet): 5549,43 (bestimmt): 5549,05
Rt=15,85 min, Ausbeute: 142 mg (17%)

Peptid 2

Par64-92 (C68A/Q80B)

H-Val-Val-Val-Phe-Ser-**Ala**-Pro-Val-Leu-Glu-Pro-Thr-Gly-Pro-Leu-His-Thr-**Gln(Dns)**-Phe-Gly-Tyr-His-Ile-Ile-Lys-Val-Leu-Tyr-Arg-Asn-OH

m/z (berechnet): 3572,6 (bestimmt): 3573,4
Rt=16,0 min, Ausbeute: 60 mg (15%)

Peptid 3

16mer

H-Arg-Ile-Val-Asp-Ala-Val-Leu-Glu-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala-Tyr-OH

m/z (berechnet): 1702,88 (bestimmt): 1703,13
Rt=12,0 min, Ausbeute: 84 mg (33%)

5.10.3 Rekombinante Synthese und Reinigung von Trypsin D189K/K60E

Zur Expression von Trypsinogen in Hefe wurden 1,4 Liter YPD-Medium mit 20 ml einer Vorkultur angeimpft und für 4 Tage bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Dabei erfolgt aufgrund einer geringeren Glucosekonzentration (von 8% auf 1,2%) die Expression des Proteins. Nach Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand auf pH 4,5 eingestellt und für weitere 15 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 2 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,5 äquilibrierte Toyopearl 650M Säule (Kationenaustauscher) geladen. Nach Waschen der Säule wurde Trypsinogen mit einem linearen pH Gradienten eluiert (2 mM Natriumacetat, pH 4,5 bis 200 mM Tris/HCl, pH 8,0). Die Trypsinogen enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und mit Centriprep YM-10 auf 5-10 ml aufkonzentriert. Zur Aktivierung des Trypsinogens diente Enterokinase (0,5-2,0 µl; 10000 Units), nachdem die Proteinlösung auf pH 6,5 eingestellt wurde. Die Aktivierung wurde mittels SDS-PAGE verfolgt und war nach 2-3tägiger Inkubation bei Raumtemperatur abgeschlossen.

Die Reinigung von Trypsin D189K/K60E erfolgte mit dem starken Anionenaustauscher 20HQ unter Verwendung des Biocad Sprint-Systems und folgender Puffer: Säulenpuffer (50 mM Bis-Tris-Propan, pH 6,8), Elutionspuffer (50 mM Bis-Tris-Propan, 0,9 M NaCl, pH 6,8). Zuvor wurde die Proteinlösung gegen den Säulenpuffer dialysiert. Zur Elution des gebundenen rekombinanten Proteins diente ein linearer Salzgradient (0-0,9 M NaCl im Säulenpuffer). Die Protein-haltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereinigt. Nach dem Aufkonzentrieren mit Centriprep YM-10 wurde die Proteinlösung aus Stabilitätsgründen gegen 1 mM HCl dialysiert und lyophilisiert. Es konnten 5-6 mg des Proteins pro Liter Kulturüberstand isoliert werden.

5.11 Einfluß von Harnstoff auf Protease-katalysierte Hydrolysereaktionen

Untersuchungen zur Aktivität der Proteasen in Harnstoff erfolgten nach Anisimova et al. [1996].

Aktivität der V8-Protease in 2 M Harnstoff

Die Reaktion wurde in verschließbaren 1,5 ml Polypropylengefäßen bei 37 °C in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 8,0 durchgeführt. Es diente eine 6,1 mM Stammlösung des Substrates Z-Glu-OMe in Puffer und 5% DMF. Die Enzymstammlösung betrug 44 µM. Zu 220 µl Puffer (+ 4,1 M Harnstoff frisch gelöst) wurde 10 µl Enzym gegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach

4 Stunden wurden diesem Vorinkubationsansatz 220 μ l der Substratstammlösung zugesetzt. Die Hydrolysereaktion wurde in Zeitabhängigkeit abgestoppt (50% Methanol, 2,5% TFA) und mittels RP-HPLC analysiert. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

Aktivität der Trypsinvariante D189K/K60E in 2 M Harnstoff

Zunächst wurde eine 4,2 M Harnstoff-Stammlösung in 0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl_2 , pH 8,0 hergestellt. Es wurden 20 μ l der Trypsinvariante (Stammlösung: 84 μ M) zu 165 μ l der Harnstoff-Stammlösung gegeben. Nach 4stündiger Vorinkubation des Enzyms in Harnstoff wurden dem Ansatz 165 μ l einer 4,2 mM Stammlösung von Ac-Tyr-OMe zugesetzt, welche in 5% DMF und 95% 0,2 M HEPES, 0,2 M NaCl, 0,02 M CaCl_2 , pH 8,0 hergestellt wurde. Die Konzentration von Ac-Tyr-OMe und Harnstoff im Hydrolyseansatz betrug 2 mM bzw. 2 M. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden 30 μ l Reaktionsgemisch mit 70 μ l Stopplösung (50% Methanol, 2,5% TFA) versetzt. Die Analyse der Hydrolysereaktion erfolgte mit RP-HPLC bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Ebenso wurden Hydrolysereaktionen in Abwesenheit des Enzyms sowie von Harnstoff bzw. in Gegenwart von 2 M GdmHCl durchgeführt.

5.12 Ligationsreaktionen

5.12.1 Enzymatische Ligationsreaktionen

Die Ligationsreaktionen wurden in 1,5 ml Polypropylengefäßen durchgeführt. Trypsin D189K/K60E-katalysierte Reaktionsansätze wurden bei 30 °C in HEPES-Puffer, pH 8,0 und V8-Protease-katalysierte bei 37 °C in Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0 in einem Eppendorf Thermomixer 5436 inkubiert. In Gegenwart Cystein-enthaltender Substrate wurde dem Reaktionspuffer TCEP zugesetzt. Die Konzentrationen zusätzlicher Salze sind an der Stelle ihres Vorkommens vermerkt. Thioestersubstrate und Nukleophile wurden kurz vor Gebrauch im jeweiligen Reaktionspuffer gelöst, wobei den Stammlösungen entsprechende Mengen Harnstoff zugesetzt wurden, so dass dessen Endkonzentration im Reaktionsansatz 2 M betrug. Der Acyldonorester Bz-Gly-SPhOH wurde ebenfalls im entsprechenden Reaktionspuffer gelöst, wobei die Lösung bis zu 10% DMF zur Löslichkeitsvermittlung enthielt. Die Überführung universeller Ausgangsester in Substratmimetika für Trypsin D189K/K60E und V8-Protease erfolgte parallel, wobei das jeweilige Thiol direkt dem Reaktionsansatz

zugegeben wurde. Die eingesetzten Konzentrationen aller Reaktanten sind, wenn nicht anders aufgeführt, den jeweiligen Legenden zu entnehmen.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Enzyms gestartet, wobei V8-Protease mit Thioglykolsäure für 5 Minuten vorinkubiert wurde. Der pH-Wert der Reaktionsansätze mußte gegebenenfalls mit 1 N NaOH auf pH 8,0 nachjustiert werden. Um das Ausmaß einer spontanen Aminolyse zu untersuchen, wurden Kontrollansätze ohne Proteasen mitgeführt. Die Analyse der Reaktionen erfolgte nach unterschiedlichen Zeitintervallen mittels SDS-PAGE, Tricin-SDS-PAGE und MALDI-ToF-Massenspektrometrie, nachdem der Reaktionsansatz über ZipTip_{C4}-Pipettenspitzen entsalzt wurde. Außerdem wurden die Reaktionen nach Zugabe von Stopplösung (50% Methanol, 2,5% TFA) HPLC-chromatographisch aufgetrennt und die entsprechenden Peaks massenspektrometrisch analysiert. Ligationsansätze zur Synthese der Parvulinvariante wurden weiterhin für einen PPIase-Test eingesetzt (vgl. 5.16).

Ligationsreaktionen mit Cys(NTB)-geschütztem Parvulinfragment-Thioester erfolgten wie im weiteren beschrieben. Es wurde eine 10 mM Stammlösung von Cys(NTB)-Par43-SPhOH in DMF und eine 1,75 mM Stammlösung des C-terminalen Fragmentes Par44-92 (C68A/Y90X) in 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 2,5 M GdmHCl, pH 8,0 hergestellt. Nachdem das C-terminale Fragment mit dem Ester versetzt wurde, erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe des Enzyms. Die Konzentration der Reaktanten im Ansatz betrug 1 mM Cys(NTB)-Par43-SPhOH, 1,4 mM Par44-92 (C68A/Y90X) und 65 µM Trypsin D189K/K60E. Die Endkonzentration von GdmHCl betrug 2 M. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde jeweils ein Aliquot mit Stopplösung (95% Methanol, 5% TFA) versetzt und mittels RP-HPLC sowie MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. Die Detektion erfolgte bei 220 und 320 nm. Desweiteren wurden Fluoreszenzmessungen bei einer Emissionswellenlänge von 320 nm durchgeführt. Ebenso diente ein entsprechender Ansatz ohne Protease als Kontrolle. Alle Ergebnisse stellen Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen dar.

5.12.2 Native Chemical Ligation

Die Reaktion wurde in 1,5 ml verschließbaren Polypropylengefäßen in 50 mM Natriumphosphat, 6 M GdmHCl, 5 mM TCEP, pH 7,8 bei 30 °C durchgeführt. Die Konzentration der Reaktanten Par43-SSe und Cys-CD36 betrug 1 mM. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden dem Reaktionsansatz Aliquote entnommen, diese mit Stopplösung (50% Methanol, 2,5% TFA) versetzt und mittels RP-HPLC und anschließender MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert.

Die Natürlich Chemische Ligationsreaktion mit Cys(NTB)-geschütztem Thioester wurde folgendermaßen durchgeführt. Es wurde eine 10 mM Stammlösung von Cys(NTB)-Par43-SSe in DMF und von 3,2 M MESNA in destilliertem Wasser hergestellt. Nachdem der Thioester mit MESNA für 5 Minuten vorinkubiert wurde, erfolgte die Zugabe des *N*-terminalen Cys-Peptides CD36 (1,36 mM im Puffer). Die Reaktion wurde in entgastem 50 mM Natriumphosphat, 6 M GdmHCl, pH 7,8 unter Argon durchgeführt. Die Konzentration der Reaktanten im Ligationsansatz betrug 0,15 mM Cys(NTB)-Par43-SSe, 100 mM MESNA und 1,3 mM Cys-CD36. Die Reaktion wurde nach 18 Stunden mit einer sauren Lösung (95% DMF, 5% TFA) abgestoppt und mittels HPLC und MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. Das Cys-geschützte Ligationsprodukt wurde isoliert, mit 30 mM TCEP bzw. DTT versetzt und wiederum ins HPLC-System injiziert. Die Detektion erfolgte bei 220 und 280 bzw. 320 nm. Die Identität des Cys-freien Ligationsproduktes wurde mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie überprüft. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

5.13 Untersuchungen zur Stabilität der Parvulinfragment-Thioester

Die Peptid-Thioester wurden im entsprechenden Puffer (0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 8,0 bzw. 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 2 M Harnstoff, pH 8,0 und 10 mM CAPS, 1 mM TCEP, 2 M Harnstoff, pH 10,0) in einer Konzentration von 1 mM gelöst. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde jeweils ein Aliquot mit Stopplösung (50% Methanol, 2,5% TFA bzw. 95% DMF, 5% TFA) versetzt. Die Analyse der Reaktionsgemische erfolgte mittels RP-HPLC bei einer Wellenlänge von 220 nm. Die Identität der gebildeten Produkte wurde mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie nachgewiesen.

Zur Untersuchung der Stabilität von Cys(NTB)-Par43-SSe in Gegenwart von Thiolen wurde eine 10 mM Stammlösung des Esters in DMF und eine 160 mM Stammlösung des entsprechenden Thiols (4-Mercaptophenol, Benzylmercaptan bzw. MESNA) in Ethanol bzw. destilliertem Wasser hergestellt. Zunächst wurde der Puffer (0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,02 M CaCl₂, 2,5 M GdmHCl, pH 8,0) mit der Thiol-Stammlösung versetzt und die Reaktion durch Zugabe des Esters gestartet. Die Konzentration der Reaktanten im Ansatz betrug 1 mM Ester und 4 mM Thiol. Der Reaktionsansatz wurde bei 30 °C inkubiert und nach unterschiedlichen Zeiten jeweils ein Aliquot mit Stopplösung (95% Methanol, 5% TFA) versetzt und mittels RP-HPLC sowie MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. Die Detektion erfolgte bei 220 und 320 nm.

5.14 Einführung von Cystein-Schutzgruppen

Zur Einführung der Cystein-Schutzgruppe 2-Nitro-5-thiobenzoessäure wurde lyophilisierter Par43-SSe bzw. Par43-SPhOH mit einer 15 mM DTNB-Stammlösung in 50 mM Natriumphosphat, 3,2 M GdmHCl, pH 6,0 versetzt. Die Endkonzentration an Thioester betrug 1 mM. Der Cys(NTB)-geschützte Parvulinfragment-Thioester wurde an einem präparativen HPLC-System der Firma Sykam vom überschüssigen DTNB gereinigt und dessen Identität mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie überprüft. Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

Die Einführung von Cystein als Schutzgruppe wurde nach Rudolph et al. [1997] durchgeführt. Dazu wurde eine 10 mM Stammlösung von Par43-SSe in DMF sowie 0,1 M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,5 hergestellt. Der Puffer enthielt zudem 3 mM Cystein sowie 0,3 mM Cystin. Nach Zugabe des Esters zum Reaktionspuffer erfolgte die Inkubation des Ansatzes bei 30 °C. Es wurden zeitabhängig Aliquote des Ansatzes mit saurer Stopplösung (95% DMF, 5% TFA) versetzt und mit HPLC sowie MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

5.15 Proteinanalytik

Proteingelelektrophorese und Western-Blot

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach der Methode nach Laemmli aufgetrennt [Laemmli, 1970]. Die Durchführung der Tricin-SDS-PAGE erfolgte zur besseren Auftrennung kleiner Proteinfragmente [Schagger & Vonjagow, 1987]. Im Falle Thiol-sensitiver Proteine wurde dem Probenpuffer anstelle von β -Mercaptoethanol das reduktive Agens TCEP zugesetzt [Burns et al., 1991]. Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte nach der Coomassie-Brillant-Blau-Färbemethode [Read & Northcote, 1981] bzw. durch Silberfärbung nach Heukeshoven & Dernick [1985] sowie nach der Schnellsilberfärbemethode nach Nesterenko et al. [1994].

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden diese elektrophoretisch in einer Blotkammer Mini-Trans-Blot-Cell (Biorad) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (80 min, 400 mA). Anschließend wurde diese mit dem primären Antikörper (spezifischer Antikörper gegen Parvulin 10) in einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um unspezifische Bindungen des Antiserums zu reduzieren, wurde die Membran zuvor mit 5% Milch in TBST-Puffer für 2 Stunden bei 25 °C geblockt. Die

Inkubation der Membran mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Anti-IgG-Kaninchen Antikörper (Antikörper-Enzym-Konjugat, welches gegen den primären Antikörper gerichtet ist) erfolgte nach mehreren Waschschritten mit TBST-Puffer in einer Verdünnung von 1:1000 für 1 Stunde bei 25 °C. Die spezifische Bindung des Antiserums an Parvulin bzw. Parvulinfragmente wurde mittels ECL western blotting analysis system (Amersham) detektiert. Durch Peroxidase-katalysierte Oxidation von Luminol kommt es zu einer verstärkten Chemilumineszenz (maximale Lichtemission bei 428 nm), welche mittels eines Blaulicht-sensitiven Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL, Amersham) in Sekunden bzw. Minuten detektiert werden kann.

TBST-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 150 mM NaCl
 0,05% Tween-20

Bestimmung der Proteinkonzentration, molekularen Masse und N-terminalen Aminosäuresequenz

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford [1976] sowie spektrophotometrisch bei 280 nm bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine wurden mit dem Programm ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) berechnet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Intein-Fusionsproteinen in Zellaufschlüssen diente BSA als Standard. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mit dem Programm AIDA.

Die molekularen Massen der Proteine bzw. Proteinfragment-Thioester wurden mit dem Programm PeptideMass (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>) sowie ChemDraw berechnet. MALDI-ToF-Massenspektren wurden an einem Reflex-Massenspektrometer und ESI-Massenspektren mit einem ESQUIRE-LC der Firma Bruker aufgenommen. Diese Versuche wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn, Frau K. Walther, Frau C. Gersching und Herrn Dr. M. Kipping durchgeführt.

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz diente ein Proteinsequenzer Modell 476A (gas-phase sequencer module, Applied Biosystems). Diese Versuche wurden freundlicherweise von Herrn Dr. K. P. Rücknagel durchgeführt.

RP-HPLC-Analysen

Die RP-HPLC-Analysen wurden an einem HPLC-System mit Bischoff Central Prozessor, UV1000 Durchflußdetektor, P2000 Pumpensystem und einem CSI-D/A-Wandler sowie TSP Autosampler AS3000 der Firma Thermoseparation Products durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Hyperdata 2.06 Software. Weiterhin fand ein HPLC-System der Firma Gilson mit Autoinjektor 235, UV/VIS-155-Detektor, Pumpensystem 321 und zugehöriger Gilson-Unipoint-Software Anwendung. Zur Elution wurden folgende Laufmittel verwendet: A (95% destilliertes Wasser/4,9% ACN/0,1% TFA) und B (95% ACN/4,9% destilliertes Wasser/0,1% TFA). Die Trennung erfolgte mit unterschiedlichen Gradienten auf folgenden Säulen:

C8 (Type SG 120Å, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm, Shiseido)

C8 (Type SG 300Å, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm, Shiseido)

C4 (214TP54, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm, Vydac)

C18 (218TP54, 300Å, 5 µm, 4,5 x 250 mm, Vydac)

C18 (5 µm, 4,5 mm x 250 mm, Merck).

CD-Spektroskopie

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie nutzt die Polarisation des Lichtes, welche auf der Überlagerung einer rechts- und einer links-zirkular polarisierten Lichtwelle zu linear polarisiertem Licht beruht. Diese Methode nutzt die unterschiedliche Absorption der links- und rechts-zirkular polarisierten Komponente aus. Es ergibt sich aufgrund unterschiedlicher Absorptionskoeffizienten für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht (ϵ_L bzw. ϵ_R) die Differenz $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$, welche als Elliptizität Θ bezeichnet und in der CD-Spektroskopie gemessen wird.

$$\Theta(\lambda) = \text{const.} (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d$$

Dabei ist d die Schichtdicke der Küvette und c die Konzentration der Probe. Im CD-Spektrum wird die Abhängigkeit der Elliptizität Θ von der Wellenlänge λ aufgezeichnet.

Da die Amidbindung ein Chromophor darstellt, kann die CD-Spektroskopie zur Analyse von Proteinsekundärstrukturen im Spektralbereich von etwa 160 bis 250 nm (UV-CD-Spektroskopie) eingesetzt werden. In diesem Spektralbereich liegen die $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge der Peptidbindung. Der $n \rightarrow \pi^*$ Übergang ist gegenüber dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang

meist schwach und erscheint als Minimum bei ca. 220 nm. Der $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang ist gewöhnlich stärker und erscheint als Maximum bei ca. 192 nm und als Minimum bei ca. 210 nm. Für die Sekundärstrukturelemente α -Helix und β -Faltblatt ergeben sich charakteristische CD-Spektren. Die α -helikale Konformation zeichnet sich durch Minima bei ca. 222 und 208 nm und durch ein Maximum bei 192 nm aus. β -Faltblattstrukturen sind durch ein Minimum bei 216 nm und ein Maximum bei ca. 195 nm charakterisiert. Die ungeordnete Konformation (random coil) zeigt ein ausgeprägtes Minimum unterhalb von 200 nm.

CD-Spektren wurden am JASCO J-710 Spektralphotometer aufgenommen. Die Proteinlösungen wurden gegen 5 mM Natrium-Phosphat, pH 7,5 dialysiert. Für die Versuche mit Harnstoff wurde dem Puffer die entsprechende Menge zugesetzt. Die CD-Messungen erfolgten bei 20 °C in einer 0,1 cm Quarzglasküvette. Es wurden jeweils 10 Messungen mit folgenden Parametern durchgeführt: λ : 260-190 nm; Auflösung: 0,5 nm; Bandbreite: 1,0 nm; Sensitivität: 20 mdeg; Geschwindigkeit: 50 nm/min; „response“-Zeit: 20 nm/min.

5.16 Bestimmung der PPIase-Aktivität

Die PPIase-Aktivität wurde im Protease-gekoppelten Meßsystem nach Fischer et al. [1984b] und im Protease-freien Meßsystem nach Janowski et al. [1997] bestimmt. Die Messungen wurden in 35 mM HEPES, pH 7,8 in einer 1 cm Quarzglasküvette mit Magnetrührer bei 10 °C mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA an einem Hewlett Packard 8452A Dioden-Array UV/VIS-Spektrophotometer durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Sigma Plot.

Protease-gekoppeltes Meßsystem

Die PPIase-Aktivität im Protease-gekoppelten Test wurde mit Chymotrypsin (100 mg/ml) und dem Substrat in einer Konzentration von 30 mg/ml gelöst in DMSO durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 390 nm und der Referenzwellenlänge von 510 nm. Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte ein Fit nach Gleichung 3.3. Entsprechend Gleichung 3.4 wurde die Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion ermittelt. Zur Bestimmung der Spezifitätskonstanten k_{kat}/K_M wurde die Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion gegen die Konzentration an Parvulin aufgetragen. Es erfolgte ein Fit durch lineare Regression nach der Gleichung $y = y_0 + ax$, wobei aus dem Anstieg der Geraden k_{kat}/K_M ermittelt wurde.

Bestimmung der Spezifitätskonstanten für Parvulin 10

Zur Bestimmung der Spezifitätskonstanten von Parvulin 10 wurden zu 1200 µl Puffer jeweils 20 µl einer Parvulinlösung (15-110 nM, Endkonzentration: 0,25-1,8 nM) sowie 3 µl der Chymotrypsinlösung zugegeben. Nach 4minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Substrat gestartet.

Bestimmung der PPIase-Aktivität aus Reaktionsansätzen

Jeweils 20 µl des jeweiligen Reaktionsansatzes wurden nach unterschiedlichen Zeiten mit 4 µl Stopplösung versetzt und davon 20 µl für den PPIase-Test analog der Bestimmung der Spezifitätskonstanten verwendet. Der jeweilige Meßansatz enthielt folgende Konzentrationen der Reaktanten: 13,6 µM Par43-SSe, 19,1 µM Par44-92 (C68A/Y90X), 54,5 µM 4-Mercaptophenol, 0,9 µM Trypsin D189K/K60E sowie 27 mM Harnstoff.

Untersuchung zur Spaltung des Substrates Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA durch Trypsin D189K/K60E

Zu 1200 µl Puffer wurden 10 µl Trypsin D189K/K60E (270 µM) sowie 3 µl Chymotrypsin zugegeben und für 4 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Substrat gestartet. Die Konzentration der Trypsinvariante im Meßansatz betrug 2,2 µM.

Protease-freies Meßsystem

Die Messungen wurden in einem Ansatzvolumen von insgesamt 1500 µl durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Menge des vortemperierten Puffers zunächst für 4 Minuten mit 4 µl einer 400 µM BSA-Lösung sowie 20,4 µl einer 1 mM Par43-SSe oder 20,5 µl einer 1,4 mM Par44-92 (C68A/Y90X)-Stammlösung inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl einer 15 mM Substratlösung in 0,55 M LiCl/TFE wurde die Reaktion bei 336 nm detektiert. Die Konzentrationen der Parvulinfragmente Par43-SSe und Par44-92 (C68A/Y90X) betragen wie im Protease-gekoppelten Test 13,6 µM bzw. 19,1 µM. Die Auswertung der Reaktionskinetik erfolgte durch einen Fit entsprechend Gleichung 3.2.

Alle Ergebnisse stellen Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Meßreihen dar.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsen, L., Tom, J., Burnier, J., Butcher, K. A., Kossiakoff, A. und Wells, J. A. (1991). **Biochemistry**, **30**, 4151-4159.
- Akaji, K., Fujii, N., Yajima, H., Hayashi, K., Mizuta, K., Aono, M. und Moriga, M. (1985). **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, **33**, 184-201.
- Alarco, C. M. und Heitman, J. (1997). **Mol Biol Cell**, **17**, 5968-5975.
- Alsina, J., Yokum, T. S., Albericio, F. und Barany, G. (1999). **J Org Chem**, **64**, 8761-8769.
- Alvarez-Arroyo, M. V., Yague, S., Wenger, R. M., Pereira, D. S., Jimenez, S., Gonzalez-Pacheco, F. R., Castilla, M. A., Deudero, J. J. und Caramelo, C. (2002). **Circ Res**, **91**, 202-209.
- Andreeva, L., Heads, R. und Green, C. J. (1999). **Int J Exp Pathol**, **80**, 305-315.
- Anfinsen, C. B. (1973). **Science**, **181**, 223-230.
- Anisimova, V. V., Filippova, I. Y., Lysogorskaya, E. N., Oksenoit, E. S., Kolobanova, S. V. und Stepanov, V. M. (1996). **Int J Pept Protein Res**, **47**, 28-35.
- Arevalo-Rodriguez, M., Cardenas, M. E., Wu, X., Hanes, S. D. und Heitman, J. (2000). **Embo J**, **19**, 3739-3749.
- Ayers, B., Blaschke, U. K., Camarero, J. A., Cotton, G. J., Holford, M. und Muir, T. W. (1999). **Biopolymers**, **51**, 343-354.
- Baca, M. und Kent, S. B. (1993). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **90**, 11638-11642.
- Baca, M., Muir, T. W., Schnolzer, M. und Kent, S. B. H. (1995). **J Am Chem Soc**, **117**, 1881-1887.
- Bae, J. H., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M. H. J., Azim, M. K., Kim, J. S., Zumbusch, A., Holak, T. A., Moroder, L., Huber, R. und Budisa, N. (2003). **J Mol Biol**, **328**, 1071-1081.
- Bednar, R. A., Fried, W. B., Lock, Y. W. und Pramanik, B. (1989). **J Biol Chem**, **264**, 14272-14276.
- Beligere, G. S. und Dawson, P. E. (1999). **J Am Chem Soc**, **121**, 6332-6333.
- Bordusa, F., Ullmann, D., Elsner, C. und Jakubke, H. D. (1997). **Angew Chem Int Ed Engl**, **36**, 2473-2475.
- Bordusa, F. (2000). **Braz J Med Biol Res**, **33**, 469-485.
- Bordusa, F. (2002a). **Curr Protein Pept Sci**, **3**, 159-180.
- Bordusa, F. (2002b). **Chem Rev**, **102**, 4817-4868.
- Botti, P., Carrasco, M. R. und Kent, S. B. H. (2001). **Tetrahedron Lett**, **42**, 1831-1833.
- Bradford, M. M. (1976). **Anal Biochem**, **72**, 248-254.
- Brenner, M., Zimmermann, J. P., Wehrmuller, J., Quitt, P., Hartmann, A., Schneider, W. und Beglinger, U. (1957). **Helvetica Chimica Acta**, **40**, 1497-1517.

- Brygier, J., Vincentelli, J., Nijs, M., Guermant, C., Paul, C., Baeyens-Volant, D. und Looze, Y. (1994). **Appl Biochem Biotechnol**, **47**, 1-10.
- Budisa, N., Minks, C., Alefelder, S., Wenger, W., Dong, F., Moroder, L. und Huber, R. (1999). **Faseb J**, **13**, 41-51.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). **Biotechniques**, **5**, 376-378.
- Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J. und Whitesides, G. M. (1991). **J Org Chem**, **56**, 2648-2650.
- Camarero, J. A. und Muir, T. W. (1999). **J Am Chem Soc**, **121**, 5597-5598.
- Camarero, J. A., Shekhtman, A., Campbell, E. A., Chlenov, M., Gruber, T. M., Bryant, D. A., Darst, S. A., Cowburn, D. und Muir, T. W. (2002). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **99**, 8536-8541.
- Camarero, J. A., Hackel, B. J., de Yoreo, J. J. und Mitchell, A. R. (2004). **J Org Chem**, **69**, 4145-4151.
- Cerovsky, V. und Bordusa, F. (2000). **J Pept Res**, **55**, 325-329.
- Cerovsky, V., Kockskamper, J., Glitsch, H. G. und Bordusa, F. (2000). **Chembiochem**, **1**, 126-129.
- Cha, M. K., Kim, H. K. und Kim, I. H. (1995). **J Biol Chem**, **270**, 28635-28641.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. und Harrison, P. R. (1986). **Embo J**, **5**, 1221-1227.
- Chin, J. W., Cropp, T. A., Anderson, J. C., Mukherji, M., Zhang, Z. und Schultz, P. G. (2003a). **Science**, **301**, 964-967.
- Chin, J. W., Cropp, T. A., Chu, S., Meggers, E. und Schultz, P. G. (2003b). **Chem Biol**, **10**, 511-519.
- Chong, S., Shao, Y., Paulus, H., Benner, J., Perler, F. B. und Xu, M. Q. (1996). **J Biol Chem**, **271**, 22159-22168.
- Chong, S., Mersha, F. B., Comb, D. G., Scott, M. E., Landry, D., Vence, L. M., Perler, F. B., Benner, J., Kucera, R. B., Hirvonen, C. A., Pelletier, J. J., Paulus, H. und Xu, M. Q. (1997). **Gene**, **192**, 271-281.
- Chong, S., Montello, G. E., Zhang, A., Cantor, E. J., Liao, W., Xu, M. Q. und Benner, J. (1998a). **Nucleic Acids Res**, **26**, 5109-5115.
- Chong, S., Williams, K. S., Wotkowicz, C. und Xu, M. Q. (1998b). **J Biol Chem**, **273**, 10567-10577.
- Clippingdale, A. B., Barrow, C. J. und Wade, J. D. (2000). **J Pept Sci**, **6**, 225-234.
- Cohen, L. A. (1968). **Annu Rev Biochem**, **37**, 695-726.
- Cottingham, I. R., Millar, A., Emslie, E., Colman, A., Schnieke, A. E. und McKee, C. (2001). **Nat Biotechnol**, **19**, 974-977.
- Crestfield, A. M., Stein, W. H. und Moore, S. (1963). **J Biol Chem**, **238**, 2413-2419.
- Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I. und Kent, S. B. (1994). **Science**, **266**, 776-779.
- Delgado, C., Francis, G. E. und Fisher, D. (1992). **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, **9**, 249-304.

- DeSantis, G., Shang, X. und Jones, J. B. (1999). **Biochemistry**, **38**, 13391-13397.
- Dubendorff, J. W. und Studier, F. W. (1991). **J Mol Biol**, **219**, 45-59.
- Dyson, H. J., Merutka, G., Waltho, J. P., Lerner, R. A. und Wright, P. E. (1992). **J Mol Biol**, **226**, 795-817.
- Ellman, G. L. (1959). **Arch Biochem Biophys**, **82**, 70-77.
- Englebretsen, D. R., Garnham, B. G., Bergman, D. A. und Alewood, P. F. (1995). **Tetrahedron Lett**, **36**, 8871-8874.
- Erlanson, D. A., Chytil, M. und Verdine, G. L. (1996). **Chem Biol**, **3**, 981-991.
- Evans, T. C., Jr., Benner, J. und Xu, M. Q. (1998). **Protein Sci**, **7**, 2256-2264.
- Evans, T. C., Jr., Benner, J. und Xu, M. Q. (1999a). **J Biol Chem**, **274**, 3923-3926.
- Evans, T. C., Jr., Benner, J. und Xu, M. Q. (1999b). **J Biol Chem**, **274**, 18359-18363.
- Fanghänel, J. (2003). **Angew Chem Int Ed Engl**, **42**, 490-492.
- Fanghänel, J. (2005). **Dissertation**, Universität Halle.
- Fersht, A. (1999). **Structure and Mechanism in Protein Science. Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding**, W. H. Freeman.
- Fischer, G., Bang, H. und Mech, C. (1984a). **Biomed Biochim Acta**, **43**, 1101-1111.
- Fischer, G., Bang, H., Berger, E. und Schellenberger, A. (1984b). **Biochim Biophys Acta**, **791**, 87-97.
- Fischer, G., Berger, E. und Bang, H. (1989). **FEBS Lett**, **250**, 267-270.
- Fischer, G. (1994). **Angew Chem Int Ed Engl**, **33**, 1415-1436.
- Flavell, R. R., Huse, M., Goger, M., Trester-Zedlitz, M., Kuriyan, J. und Muir, T. W. (2002). **Org Lett**, **4**, 165-168.
- Galat, A. und Metcalfe, S. M. (1995). **Prog Biophys Mol Biol**, **63**, 67-118.
- Gieselman, M. D., Xie, L. und van der Donk, W. A. (2001). **Org Lett**, **3**, 1331-1334.
- Gimble, F. S. (1998). **Chem Biol**, **5**, 251-256.
- Grünberg, R., Domgall, I., Günther, R., Rall, K., Hofmann, H. J. und Bordusa, F. (2000). **Eur J Biochem**, **267**, 7024-7030.
- Günther, R., Stein, A. und Bordusa, F. (2000a). **J Org Chem**, **65**, 1672-1679.
- Günther, R., Thust, S., Hofmann, H. J. und Bordusa, F. (2000b). **Eur J Biochem**, **267**, 3496-3501.
- Hanahan, D. (1983). **J Mol Biol**, **166**, 557-580.
- Hänsler, M. und Jakubke, H. D. (1996). **J Pept Sci**, **2**, 279-289.
- Harrison, R. K. und Stein, R. L. (1990). **Biochemistry**, **29**, 3813-3816.

- Harrison, R. K. und Stein, R. L. (1992). **J Am Chem Soc**, **114**, 3464-3471.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L. und Rutter, W. J. (1992). **Science**, **255**, 1249-1253.
- Heinrikson, R. L., Stein, W. H., Crestfield, A. M. und Moore, S. (1965). **J Biol Chem**, **240**, 2921-2934.
- Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, K. P., Grabley, S., Küllertz, G. und Fischer, G. (1998). **Biochemistry**, **37**, 5953-5960.
- Herman, S., Hoofman, G. und Schacht, E. (1995). **J Bioact Compat Polym**, **10**, 145-187.
- Hershfield, M. S., Buckley, R. H., Greenberg, M. L., Melton, A. L., Schiff, R., Hatem, C., Kurtzberg, J., Markert, M. L., Kobayashi, R. H., Kobayashi, A. L. et al. (1987). **N Engl J Med**, **316**, 589-596.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1985). **Electrophoresis**, **6**, 103-112.
- Hinderaker, M. P. und Raines, R. T. (2003). **Protein Sci**, **12**, 1188-1194.
- Hofmann, R. M., Cotton, G. J., Chang, E. J., Vidal, E., Veach, D., Bornmann, W. und Muir, T. W. (2001). **Bioorg Med Chem Lett**, **11**, 3091-3094.
- Hofmann, R. M. und Muir, T. W. (2002). **Curr Opin Biotechnol**, **13**, 297-303.
- Homandberg, G. A., Mattis, J. A. und Laskowski, M., Jr. (1978). **Biochemistry**, **17**, 5220-5227.
- Hondal, R. J., Nilsson, B. L. und Raines, R. T. (2001). **J Am Chem Soc**, **123**, 5140-5141.
- Hondal, R. J. und Raines, R. T. (2002). **Methods Enzymol**, **347**, 70-83.
- Hsu, T., McRackan, D., Vincent, T. S. und Gert de Couet, H. (2001). **Nat Cell Biol**, **3**, 538-543.
- Huse, M., Holford, M. N., Kuriyan, J. und Muir, T. W. (2000). **J Am Chem Soc**, **122**, 8337-8338.
- Huse, M., Muir, T. W., Xu, L., Chen, Y. G., Kuriyan, J. und Massague, J. (2001). **Mol Cell**, **8**, 671-682.
- Iakovenko, A., Rostkova, E., Merzlyak, E., Hillebrand, A. M., Thoma, N. H., Goody, R. S. und Alexandrov, K. (2000). **FEBS Lett**, **468**, 155-158.
- IMPACTTM-CN, **Instruction manual**, 2004.
- Imperiali, B. und Abeles, R. H. (1987). **Biochemistry**, **26**, 4474-4477.
- Ingenito, R., Bianchi, E., Fattori, D. und Pessi, A. (1999). **J Am Chem Soc**, **121**, 11369-11374.
- Inui, T., Bodi, J., Kubo, S., Nishio, H., Kimura, T., Kojima, S., Maruta, H., Muramatsu, T. und Sakakibara, S. (1996). **J Pept Sci**, **2**, 28-39.
- Iwai, H. und Pluckthun, A. (1999). **FEBS Lett**, **459**, 166-172.
- Jackson, D. Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J. und Wells, J. A. (1994). **Science**, **266**, 243-247.

- Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F. und Ames, B. N. (1989). **J Biol Chem**, **264**, 1488-1496.
- Jakubke, H. D. (1994). **J Chin Chem Soc**, **41**, 355-370.
- Jakubke, H. D. (1996). **Peptide: Chemie und Biologie**, Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag.
- Janowski, B., Wollner, S., Schutkowski, M. und Fischer, G. (1997). **Anal Biochem**, **252**, 299-307.
- Jansen, E. F., Nutting, M. D. F. und Balls, A. K. (1949). **J Biol Chem**, **179**, 201-204.
- Jansen, E. F., Nutting, M. D. F., Jang, R. und Balls, A. K. (1950). **J Biol Chem**, **185**, 209-220.
- Kawakami, T., Hasegawa, K., Teruya, K., Akaji, K., Horiuchi, M., Inagaki, F., Kurihara, Y., Uesugi, S. und Aimoto, S. (2001). **J Pept Sci**, **7**, 474-487.
- Keating, M. J., Holmes, R., Lerner, S. und Ho, D. H. (1993). **Leuk Lymphoma**, **10 Suppl**, 153-157.
- Kent, S. B. (1988). **Annu Rev Biochem**, **57**, 957-989.
- Kern, G., Kern, D., Schmid, F. X. und Fischer, G. (1995). **J Biol Chem**, **270**, 740-745.
- Khor, E. (1997). **Biomaterials**, **18**, 95-105.
- Khumtaveeporn, K., Ullmann, A., Matsumoto, K., Davis, B. G. und Jones, J. B. (2001). **Tetrahedron-Asymmetry**, **12**, 249-261.
- Kinsland, C., Taylor, S. V., Kelleher, N. L., McLafferty, F. W. und Begley, T. P. (1998). **Protein Sci**, **7**, 1839-1842.
- Kleber, H.-P., Schlee, D. und Schöpp, W. (1997). **Biochemisches Praktikum: Methoden für Studium, Praxis, Forschung**, Gustav Fischer Verlag Jena.
- Kociński, P. J. (2003). **Protecting Groups**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Kofron, J. L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colon-Bonilla, E. und Rich, D. H. (1991). **Biochemistry**, **30**, 6127-6134.
- Köhler, C., Xie, L., Kellerer, S., Varshney, U. und RajBhandary, U. L. (2001). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **98**, 14310-14315.
- Koonin, E. V., Tatusov, R. L. und Rudd, K. E. (1995). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **92**, 11921-11925.
- Kuhlewein, A., Voll, G., Hernandez Alvarez, B., Kessler, H., Fischer, G., Rahfeld, J. U. und Gemmecker, G. (2004). **Protein Sci**, **13**, 2378-2387.
- Laemmli, U. K. (1970). **Nature**, **227**, 680-685.
- LaVallie, E. R. und McCoy, J. M. (1995). **Curr Opin Biotechnol**, **6**, 501-506.
- Lazar, S. W. und Kolter, R. (1996). **J Bacteriol**, **178**, 1770-1773.
- Leung, L. L., Li, W. X., McGregor, J. L., Albrecht, G. und Howard, R. J. (1992). **J Biol Chem**, **267**, 18244-18250.

- Li, X. Q., Kawakami, T. und Aimoto, S. (1998). **Tetrahedron Lett**, **39**, 8669-8672.
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. und Buchner, J. (1993). **Protein Sci**, **2**, 1490-1496.
- Liu, J., Albers, M. W., Chen, C. M., Schreiber, S. L. und Walsh, C. T. (1990). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **87**, 2304-2308.
- Low, D. W., Hill, M. G., Carrasco, M. R., Kent, S. B. und Botti, P. (2001). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **98**, 6554-6559.
- Lu, K. P., Hanes, S. D. und Hunter, T. (1996). **Nature**, **380**, 544-547.
- Lu, W., Gong, D., Bar-Sagi, D. und Cole, P. A. (2001). **Mol Cell**, **8**, 759-769.
- Lundblad, R. L. und Noyes, C. M. (1984). **Chemical Reagents for Protein Modification Volume I**, CRC Press, Inc.
- Lykke-Andersen, J. und Christiansen, J. (1998). **Nucleic Acids Res**, **26**, 5630-5635.
- Machova, Z., von Eggelkraut-Gottanka, R., Wehofsky, N., Bordusa, F. und Beck-Sickinger, A. G. (2003). **Angew Chem Int Ed Engl**, **42**, 4916-4918.
- Macmillan, D. und Bertozzi, C. R. (2000). **Tetrahedron**, **56**, 9515-9525.
- Matsumoto, K., Davis, B. G. und Jones, J. B. (2002). **Chemistry**, **8**, 4129-4137.
- Mehl, R. A., Anderson, J. C., Santoro, S. W., Wang, L., Martin, A. B., King, D. S., Horn, D. M. und Schultz, P. G. (2003). **J Am Chem Soc**, **125**, 935-939.
- Merrifield, B. (1986). **Science**, **232**, 341-347.
- Morawietz, S. (2003). **Diplomarbeit**, Universität Halle.
- Muir, T. W., Sondhi, D. und Cole, P. A. (1998). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **95**, 6705-6710.
- Mukhopadhyay, J., Kapanidis, A. N., Mekler, V., Kortkhonjia, E., Ebright, Y. W. und Ebright, R. H. (2001). **Cell**, **106**, 453-463.
- Nakatsuka, T., Sasaki, T. und Kaiser, E. T. (1987). **J Am Chem Soc**, **109**, 3808-3810.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M. und Upton, S. J. (1994). **J Biochem Bioph Methods**, **28**, 239-242.
- Nilsson, B. L., Kiessling, L. L. und Raines, R. T. (2000). **Org Lett**, **2**, 1939-1941.
- Nilsson, B. L., Hondal, R. J., Soellner, M. B. und Raines, R. T. (2003). **J Am Chem Soc**, **125**, 5268-5269.
- Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Griffith, M. C. und Schultz, P. G. (1989). **Science**, **244**, 182-188.
- Noren, C. J., Wang, J. und Perler, F. B. (2000). **Angew Chem Int Ed Engl**, **39**, 450-466.
- Nowak, M. W., Gallivan, J. P., Silverman, S. K., Labarca, C. G., Dougherty, D. A. und Lester, H. A. (1998). **Methods Enzymol**, **293**, 504-529.
- Offer, J., Boddy, C. N. und Dawson, P. E. (2002). **J Am Chem Soc**, **124**, 4642-4646.

- Paulus, H. (2000). **Annu Rev Biochem**, **69**, 447-496.
- Perler, F. B., Davis, E. O., Dean, G. E., Gimble, F. S., Jack, W. E., Neff, N., Noren, C. J., Thorner, J. und Belfort, M. (1994). **Nucleic Acids Res**, **22**, 1125-1127.
- Perler, F. B., Xu, M. Q. und Paulus, H. (1997). **Curr Opin Chem Biol**, **1**, 292-299.
- Perler, F. B. (2002). **Nucleic Acids Res**, **30**, 383-384. (<http://www.neb.com/neb/inteins.html>).
- Pöhlmann, A. (2000). **Diplomarbeit**, Universität Leipzig.
- Porter, J. A., Ekker, S. C., Park, W. J., von Kessler, D. P., Young, K. E., Chen, C. H., Ma, Y., Woods, A. S., Cotter, R. J., Koonin, E. V. und Beachy, P. A. (1996). **Cell**, **86**, 21-34.
- Powers, J. C. (1977). **Methods Enzymol**, **46**, 197-208.
- Quaderer, R. und Hilvert, D. (2001). **Org Lett**, **3**, 3181-3184.
- Quaderer, R. und Hilvert, D. (2002). **Chem Commun (Camb)**, 2620-2621.
- Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K. und Fischer, G. (1994a). **FEBS Lett**, **343**, 65-69.
- Rahfeld, J. U., Rücknagel, K. P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K. und Fischer, G. (1994b). **FEBS Lett**, **352**, 180-184.
- Rall, K. (2004). **Dissertation**, Universität Halle.
- Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T. und Noel, J. P. (1997). **Cell**, **89**, 875-886.
- Read, S. M. und Northcote, D. H. (1981). **Anal Biochem**, **116**, 53-64.
- Ren, B. Y., Gao, F., Tong, Z. und Yan, Y. (1999). **Chemical Physics Letters**, **307**, 55-61.
- Richards, F. M. und Vithayathil, P. J. (1959). **J Biol Chem**, **234**, 1459-1465.
- Roelfes, G. und Hilvert, D. (2003). **Angew Chem Int Ed Engl**, **42**, 2275-2277.
- Rose, K. (1994). **J Am Chem Soc**, **116**, 30-33.
- Roy, R. S., Allen, O. und Walsh, C. T. (1999). **Chem Biol**, **6**, 789-799.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. und Jaenicke R. (1997). **Protein Function: A Practical Approach**, Creighton, T. E. ed, 57-99.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: A Laboratory Manual**, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sancho, J. und Fersht, A. R. (1992). **J Mol Biol**, **224**, 741-747.
- Sato, T. und Aimoto, S. (2003). **Tetrahedron Lett**, **44**, 8085-8087.
- Saxon, E. und Bertozzi, C. R. (2000). **Science**, **287**, 2007-2010.
- Schagger, H. und Vonjagow, G. (1987). **Anal Biochem**, **166**, 368-379.
- Schechter, I. und Berger, A. (1967). **Biochem Biophys Res Commun**, **27**, 157-162.

- Schein, C. H. (1990). **Biotechnology (N Y)**, **8**, 308-317.
- Schelbert, B. (1998). **Dissertation**, Universität Halle.
- Schellenberger, V., Schellenberger, U., Jakubke, H. D., Zapevalova, N. P. und Mitin, Y. V. (1991). **Biotechnol Bioeng**, **38**, 319-321.
- Scherer, G., Kramer, M. L., Schutkowski, M., Reimer, U. und Fischer, G. (1998). **J Am Chem Soc**, **120**, 5568-5574.
- Schmid, F. X., Mayr, L. M., Mucke, M. und Schonbrunner, E. R. (1993). **Adv Protein Chem**, **44**, 25-66.
- Schneider, J. und Kent, S. B. (1988). **Cell**, **54**, 363-368.
- Schnolzer, M. und Kent, S. B. (1992). **Science**, **256**, 221-225.
- Schoellmann, G. und Shaw, E. (1963). **Biochemistry**, **2**, 252-255.
- Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G. und Schmid, F. X. (1997). **J Mol Biol**, **273**, 752-762.
- Schonbrunner, E. R., Mayer, S., Tropschug, M., Fischer, G., Takahashi, N. und Schmid, F. X. (1991). **J Biol Chem**, **266**, 3630-3635.
- Schreiber, S. L. (1991). **Science**, **251**, 283-287.
- Sekerina, E., Rahfeld, J. U., Müller, J., Fanghänel, J., Rascher, C., Fischer, G. und Bayer, P. (2000). **J Mol Biol**, **301**, 1003-1017.
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E. und Tanizawa, K. (1996). **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, **44**, 1577-1579.
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E. und Tanizawa, K. (1997). **Tetrahedron Lett**, **38**, 1777-1780.
- Sekizaki, H., Itoh, K., Toyota, E. und Tanizawa, K. (1998). **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, **46**, 846-849.
- Severinov, K. und Muir, T. W. (1998). **J Biol Chem**, **273**, 16205-16209.
- Sherry, B., Zybarth, G., Alfano, M., Dubrovsky, L., Mitchell, R., Rich, D., Ulrich, P., Bucala, R., Cerami, A. und Bukrinsky, M. (1998). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **95**, 1758-1763.
- Shin, Y., Winans, K. A., Backes, B. J., Kent, S. B. H., Ellman, J. A. und Bertozzi, C. R. (1999). **J Am Chem Soc**, **121**, 11684-11689.
- Sieber, P., Eisler, K., Kamber, B., Riniker, B., Rittel, W., Marki, F. und de Gasparo, M. (1978). **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, **359**, 113-123.
- Smith, R. A., Dupe, R. J., English, P. D. und Green, J. (1981). **Nature**, **290**, 505-508.
- Southworth, M. W., Amaya, K., Evans, T. C., Xu, M. Q. und Perler, F. B. (1999). **Biotechniques**, **27**, 110-114, 116, 118-120.
- Srinivasan, G., James, C. M. und Krzycki, J. A. (2002). **Science**, **296**, 1459-1462.
- Stewart, D. E., Sarkar, A. und Wampler, J. E. (1990). **J Mol Biol**, **214**, 253-260.

- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). **J Mol Biol**, **189**, 113-130.
- Surmacz, T. A., Bayer, E., Rahfeld, J. U., Fischer, G. und Bayer, P. (2002). **J Mol Biol**, **321**, 235-247.
- Swinnen, D. und Hilvert, D. (2000). **Org Lett**, **2**, 2439-2442.
- Sydor, J. R., Mariano, M., Sideris, S. und Nock, S. (2002). **Bioconjug Chem**, **13**, 707-712.
- Tam, J. P., Lu, Y. A., Liu, C. F. und Shao, J. (1995). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **92**, 12485-12489.
- Tam, J. P. und Lu, Y. A. (1998). **Protein Sci**, **7**, 1583-1592.
- Tam, J. P. und Yu, Q. (1998). **Biopolymers**, **46**, 319-327.
- Tam, J. P., Yu, Q. T. und Miao, Z. W. (1999). **Biopolymers**, **51**, 311-332.
- Tanizawa, K., Kasaba, Y. und Kanaoka, Y. (1977). **J Am Chem Soc**, **99**, 4485-4488.
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J. und Gottlinger, H. G. (1994). **Nature**, **372**, 363-365.
- Thormann, M., Thust, S., Hofmann, H. J. und Bordusa, F. (1999). **Biochemistry**, **38**, 6056-6062.
- Tolbert, T. J. und Wong, C. H. (2000). **J Am Chem Soc**, **122**, 5421-5428.
- Tsutsumi, Y., Kihira, T., Yamamoto, S., Kubo, K., Nakagawa, S., Miyake, M., Horisawa, Y., Kanamori, T., Ikegami, H. und Mayumi, T. (1994). **Jpn J Cancer Res**, **85**, 9-12.
- Tsutsumi, Y., Kihira, T., Tsunoda, S., Kanamori, T., Nakagawa, S. und Mayumi, T. (1995). **Br J Cancer**, **71**, 963-968.
- Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G. und Rahfeld, J. U. (1999). **FEBS Lett**, **446**, 278-282.
- Valiyaveetil, F. I., MacKinnon, R. und Muir, T. W. (2002). **J Am Chem Soc**, **124**, 9113-9120.
- van't Hoff, J. H. (1898). **Z. Anorg. Chem.** **18**, 1-13.
- Wagner, G. und Horn, H. (1973). **Pharmazie**, **28**, 427-431.
- Walsh, C. T., Zydowsky, L. D. und McKeon, F. D. (1992). **J Biol Chem**, **267**, 13115-13118.
- Waltho, J. P., Feher, V. A., Merutka, G., Dyson, H. J. und Wright, P. E. (1993). **Biochemistry**, **32**, 6337-6347.
- Wang, L., Brock, A., Herberich, B. und Schultz, P. G. (2001). **Science**, **292**, 498-500.
- Wang, D. und Cole, P. A. (2001). **J Am Chem Soc**, **123**, 8883-8886.
- Wang, L., Brock, A. und Schultz, P. G. (2002). **J Am Chem Soc**, **124**, 1836-1837.
- Wang, L., Zhang, Z., Brock, A. und Schultz, P. G. (2003a). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **100**, 56-61.
- Wang, L., Xie, J., Deniz, A. A. und Schultz, P. G. (2003b). **J Org Chem**, **68**, 174-176.
- Wehofsky, N. und Bordusa, F. (1999). **FEBS Lett**, **443**, 220-224.

- Wehofsky, N. (2000). **Dissertation**, Universität Leipzig.
- Wehofsky, N., Wissmann, J., Alisch, M. und Bordusa, F. (2000). **Biochim Biophys Acta**, **1479**, 114-122.
- Wehofsky, N., Löser, R., Buchynskyy, A., Welzel, P. und Bordusa, F. (2002). **Angew Chem Int Ed Engl**, **41**, 2735-2738.
- Wehofsky, N., Koglin, N., Thust, S. und Bordusa, F. (2003). **J Am Chem Soc**, **125**, 6126-6133.
- Weiss, M. S., Jabs, A. und Hilgenfeld, R. (1998). **Nat Struct Biol**, **5**, 676.
- Wieland, T., Bokelmann, E., Bauer, L., Lang, H. U. und Lau, H. (1953). **Liebigs Ann Chem**, **583**, 129-149.
- Wiernik, P. H., Dutcher, J. P., Todd, M., Caliendo, G. und Benson, L. (1994). **Am J Hematol**, **47**, 41-44.
- Wildemann, D. (2004). **Dissertation**, Universität Halle.
- Winkler, K. E., Swenson, K. I., Kornbluth, S. und Means, A. R. (2000). **Science**, **287**, 1644-1647.
- Wolf, D. L., Lin, P. H., Hollenbach, S., Wong, A., Phillips, D. R. und Sinha, U. (1995). **Blood**, **86**, 4153-4157.
- Wong, C. H., Chen, S. T., Hennen, W. J., Bibbs, J. A., Wang, Y. F., Liu, J. L. C., Pantoliano, M. W., Whitlow, M. und Bryan, P. N. (1990). **J Am Chem Soc**, **112**, 945-953.
- Woo, D. D., Clark-Lewis, I., Chait, B. T. und Kent, S. B. (1989). **Protein Eng**, **3**, 29-37.
- Wu, Z. P. und Hilvert, D. (1989). **J Am Chem Soc**, **111**, 4513-4514.
- Wu, X., Wilcox, C. B., Devasahayam, G., Hackett, R. L., Arevalo-Rodriguez, M., Cardenas, M. E., Heitman, J. und Hanes, S. D. (2000). **Embo J**, **19**, 3727-3738.
- Xu, M. Q. und Perler, F. B. (1996). **Embo J**, **15**, 5146-5153.
- Xu, R., Ayers, B., Cowburn, D. und Muir, T. W. (1999). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **96**, 388-393.
- Xu, S., Rall, K. und Bordusa, F. (2001). **J Org Chem**, **66**, 1627-1632.
- Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C. und Lu, K. P. (1997). **Science**, **278**, 1957-1960.
- Yan, L. Z. und Dawson, P. E. (2001). **J Am Chem Soc**, **123**, 526-533.
- Yu, C. (2003). **Dissertation**, Universität Halle.
- Zawadzke, L. E. und Berg, J. M. (1993). **Proteins**, **16**, 301-305.
- Zhang, L. S. und Tam, J. P. (1997). **Tetrahedron Lett**, **38**, 3-6.
- Zhang, Z. W., Wang, L., Brock, A. und Schultz, P. G. (2002). **Angew Chem Int Ed Engl**, 2840-2842.

Zhang, Z., Smith, B. A., Wang, L., Brock, A., Cho, C. und Schultz, P. G. (2003). **Biochemistry**, **42**, 6735-6746.

Zhao, Y. und Ke, H. (1996). **Biochemistry**, **35**, 7356-7361.

Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C. und Bock, A. (1986). **Proc Natl Acad Sci U S A**, **83**, 4650-4654.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. G. Fischer möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die sehr guten Arbeitsbedingungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. F. Bordusa danke ich für die Überlassung des interessanten Themas. Im besonderen danke ich ihm für die Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis während der gesamten Zeit sowie für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bedanken, insbesondere bei:

Frau Dr. K. Rall für die Überlassung von pYT D189K/K60E,

Herrn Dr. G. Jahreis für die chemischen Synthesen, vor allem die der C-terminalen Parvulinfragmente, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

Herrn P. Ozdowy für die Darstellung von Fmoc-Gln(Dns)-OH,

Frau Dr. A. Schiehorn, Frau K. Walther, Frau C. Gersching und Herrn Dr. M. Kipping für die Aufnahme der zahlreichen Massenspektren,

Herrn Dr. K. P. Rücknagel für die Proteinsequenzierung,

Frau I. Hamann für die experimentellen Arbeiten im Labor,

Frau H. Klemens für die Bereitstellung von rekombinantem Parvulin 10,

Frau Dr. N. Wehofsky, Herrn Dr. M. Malešević, Herrn Dr. D. Wildemann und Herrn T. Aumüller für ihre Diskussionsbereitschaft und wertvolle Kritik und

den „Chemikern“ für die sehr gute Teamarbeit.

Frau S. Roß und Frau Dr. B. Hernandez-Alvarez danke ich für ihre moralische Unterstützung.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Gerd und Maritta Pöhlmann, sowie meiner Tochter Sophie-Louise und Herrn Reik Zimmer bedanken, die mich stets unterstützt und ermutigt haben, mein Ziel zu verwirklichen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität vorgelegt.

Halle/Saale, Juli 2006

Angela Pöhlmann

Lebenslauf

Name: Pöhlmann
Vorname: Angela
Geburtsdatum: 11.05.1977
Geburtsort: Gera (Thüringen)
Familienstand: ledig, ein Kind

Schulbildung:

1983-1989 Polytechnische Oberschule in Gera, Schule mit erweitertem
Russischunterricht
1989-1995 Karl-Theodor-Liebe-Gymnasium in Gera

Studium:

1995-2000 Biochemiestudium an der Universität in Leipzig
Diplomarbeit an der Universität in Leipzig
Thema: Subtilisin Savinase - Ein neuer Biokatalysator für die
Substratmimetika-vermittelte CN-Ligation

2000-2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Max-Planck-Forschungsstelle für
Enzymologie der Proteinfaltung in Halle/Saale
Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. F. Bordusa
Thema: Untersuchungen zur Intein-vermittelten Semisynthese
modifizierter Proteine

Elternzeit: Juni 1999-Dezember 1999

Berufliche Tätigkeit:

ab August 2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg, Abteilung Naturstoffbiochemie unter Leitung von Prof. Dr.
F. Bordusa