

"Screening und Charakterisierung D-Aminosäure-spezifischer  
hydrolytischer Enzyme"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Andreas H. Simon

geb. am 13.12.1983 in Berlin

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Frank Bordusa
2. Prof. Dr. Kai Tittmann
3. Prof. Dr. Ralph Golbik

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. Mai 2022

It's sort of a mental attitude about critical thinking and curiosity. It's about mindset of looking at the world in a playful and curious and creative way.

Adam Savage

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Methoden zur Darstellung modifizierter Peptide und Proteine	3
1.2 Protease katalysierte Synthese von Peptiden und Proteinen	6
1.3 D-Aminosäure spezifische Enzyme	10
1.4 Techniken zur Detektion und Evolution von proteolytischer Aktivität	12
1.5 Zielstellung	15
<b>2. Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Chemische Synthesen	16
2.1.1 Synthese von benzoylierten Aminosäuremethylestern	16
2.1.2 Synthese von Substratmimetika	17
2.1.3 Synthese des intern gequenchten Fluoreszenzsubstrates	18
2.1.4 Synthese von Acylakzeptoren	19
2.2 Mikrobiologische Methoden	20
2.2.1 Verwendete Organismen	20
2.2.2 Verwendete Nährmedien	21
2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen	22
2.2.4 Fraktionierung und Aufschluss von Organismen	23
2.3 Molekularbiologische Methoden	24
2.3.1 Verwendete Enzyme und Plasmide	24
2.3.2 Isolation von DNA	25
2.3.3 Generierung von Genkonstrukten	26
2.3.4 Darstellung der DNA-Bibliotheken für die Evolution von Trypsin	27
2.4 Methoden zur Reinigung und Nachweis von Proteinen	27
2.4.1 Native Reinigung der dHy aus <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
2.4.2 Reinigung der dHy	29
2.4.3 Reinigung von Trypsin und -varianten	29
2.4.4 Untersuchung des Proteintransportes von SSAI-Trypsin	30
2.4.5 Screening nach D-stereospezifischen Trypsinvarianten	31
2.5 Charakterisierung von Enzymen	31
2.5.1 Kristallisation der dHy aus <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
2.5.2 Enzymkinetische Charakterisierungen	32
2.6 Verwendete Programme	35
	I

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1 Untersuchung nativer D-stereospezifischer Proteasen	36
3.1.1 Charakterisierung der Substratspezifität der Alkalischen D-Peptidase	36
3.1.2 Reaktivität der AdP gegenüber Abz-D-Arg-D-Ala-pNA	40
3.1.3 Detektion und Identifizierung proteolytischer Aktivität in Bacilli Stämmen	42
3.1.4 Charakterisierung der Substratspezifität der DHy aus <i>B. thuringiensis</i>	45
3.1.5 Bestimmung der Kristallstruktur der DHy aus <i>B. thuringiensis</i>	49
3.1.6 Charakterisierung der Substratspezifität DHy aus <i>B. cereus</i>	53
3.2 Evolution der Stereoselektivität von Trypsin	57
3.2.1 Charakterisierung von SSAI-Trypsin	57
3.2.2 Entwicklung eines Screeningsystems für D-stereospezifisches Trypsin	62
3.2.3 Linearisierung der Ergebnisse des Screenings	70
3.2.4 Ergebnisse des Screenings nach D-stereospezifischem Trypsin	72
3.2.5 Charakterisierung von SSAI-GFTT-Trypsin	76
<b>4. Diskussion</b>	<b>78</b>
4.1 Studien zur Alkalischen D-Peptidase	78
4.2 Verwendung von Abz-D-Arg-D-Ala-pNA als Screeningsubstrat	81
4.3 Charakterisierung der D-stereospezifischen Hydrolasen	85
4.4 Studien zu SSAI-Trypsin	91
4.5 Evolution der Stereospezifität	95
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>Anhang</b>	<b>i</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Allgemeine Strukturen von Aminosäuren, Peptidbindungen und Proteinen. ....	1
Abb. 1.2 Überblick über Katalysatoren der nicht-ribosomalen Peptidsynthese. ....	6
Abb. 1.3 Darstellung der kinetisch kontrollierten Synthese von Peptidfragmenten. ....	8
Abb. 1.4 Beispiele der stereospezifisch kontrollierten Fragmentligation. ....	10
Abb. 1.5 Allgemeine Struktur von SSAI-Trypsin. ....	14
Abb. 2.1 Reaktionsschema zur Synthese von Bz-D/L-Xaa-OMe. ....	16
Abb. 2.2 Reaktionsschema zur Synthese von Bz-Gly-OGp. ....	17
Abb. 2.3 Reaktionsschema zur Synthese von Abz-D-Arg-D-Ala-pNA. ....	18
Abb. 2.4 Darstellung des SSAI-Trypsin-Genkonstruktes. ....	27
Abb. 3.1 Nachweis proteolytischer Aktivität der ADP gegenüber Abz-D-Ala-D-Arg-pNA. ....	40
Abb. 3.2 Übersicht über die Distribution ADP-ähnlicher Proteasen. ....	41
Abb. 3.3 Lokalisierung der biologischen Aktivität gegenüber dem Abz-D-Arg-D-Ala-pNA innerhalb zweier verschiedener Bacilli-Stämme. ....	43
Abb. 3.4 Isolation der D-stereospezifischen Peptidase aus <i>B. thuringiensis</i> . ....	44
Abb. 3.5 Analyse und initiale Charakterisierung der dHy aus <i>B. thuringiensis</i> . ....	46
Abb. 3.6 Darstellung der Kristallstruktur und Übersicht über die Bindungsbereiche der dHy. ....	50
Abb. 3.7 Orientierung des Substrates Bz-D-Arg-OMe innerhalb des aktiven Zentrums der dHy. ....	52
Abb. 3.8 Alignment der in dieser Arbeit verwendeten DD-Peptidasen. ....	55
Abb. 3.9 Initiale Charakterisierung der dHy aus <i>B. cereus</i> . ....	56
Abb. 3.10 Analytik und initiale Charakterisierung von SSAI-Trypsin. ....	58
Abb. 3.11 Übersicht zu mutierenden Bereiche von Trypsin sowie deren Konservierungsgrad (KG) innerhalb der Gruppe Trypsin-ähnlicher Enzyme. ....	63
Abb. 3.12 Untersuchung des Transports während der Biosynthese von SSAI-Trypsin. ....	65
Abb. 3.13 Einfluss des Kulturmediums auf das Wachstum von <i>E. coli</i> und die Detektionsgrenzen des Substrates Abz-L-Arg-L-Ala-pNA. ....	67
Abb. 3.14 Darstellung der Optimierung der Aufschlussbedingungen zur Detektion von SSAI-Trypsin durch das Selektionssubstrat. ....	68
Abb. 3.15 Übertragung des optimierten Screeningsystems auf dHy. ....	70
Abb. 3.16 Darstellung der Selektionsparameter am Beispiel einer 96-well Mikrotiterplatte der ersten Screeningrunde der Bibliothek 226. ....	71
Abb. 3.17 Übersicht der durchgeführten Selektionsrunden von SSAI-Trypsin im Allgemeinen und Identifikation von SSAI-GFTT-Trypsin. ....	73

Abb. 3.18 Charakterisierung der $S_1$ -Substratbindungsorte der Varianten SSAI-ACMN-Trypsin und SSAI-GFTT-Trypsin.....	75
Abb. 3.19 Initiale Charakterisierung von SSAI-GFTT-Trypsin.....	76
Abb. 4.1 Schema des intern gequenchten fluorogenen Substrates.....	82
Abb. 4.2 Ligand-Interaktions-Diagramm der DHy aus <i>B. thuringiensis</i> bzw. <i>B. cereus</i> .....	88
Abb. 4.3 Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der DHy.....	90

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Übersicht über Hydrolasen verschiedener Funktionalität mit PbP-/ $\beta$ -Lactamasefaltung. ....	12
Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Stämme und deren Genotyp.....	20
Tab. 3.1 Bestimmung der spezifischen Hydrolyseaktivitäten von Bz-D/L-Xaa-OMe durch ADP.....	37
Tab. 3.2 Bestimmung der $S_1'$ - bis $S_3'$ -Substratbindungsortspezifitäten der ADP. ....	38
Tab. 3.3 Akzeptanz von Arg- und Phe-beinhaltenen <i>all</i> -L-Pentapeptidnukleophilen der ADP.....	39
Tab. 3.4 Bestimmung der $S_1$ - und $S_1'$ -Bindungsortspezifität der DHy. ....	47
Tab. 3.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten der DHy für ausgewählte Methylester.....	49
Tab. 3.6 Bestimmung der $S_1$ - und $S_1'$ -Substratbindungsortspezifitäten der DHy aus <i>B. cereus</i> . ....	57
Tab. 3.7 Übersicht über die kinetischen Parameter von Wildtyp-Trypsin und SSAI-Trypsin. ....	59
Tab. 3.8 Übersicht über Charakterisierung der $S_1$ -Bindungsortspezifitäten von SSAI-Trypsin. ....	60
Tab. 3.9 Bestimmung der $S_1'$ -Substratbindungsortspezifität von SSAI-Trypsin. ....	61
Tab. 3.10 Übersicht über die spezifischen Aktivitäten der fünf SSAI-Bib189-Trypsinvarianten im Vergleich zu SSAI-Trypsin .....	74
Tab. 3.11 Übersicht der abgeschätzten kinetischen Konstanten von SSAI-GFTT-Trypsin hydrolysierten Bz-D/L-Xaa-OMe Substraten. ....	77

## Abkürzungsverzeichnis

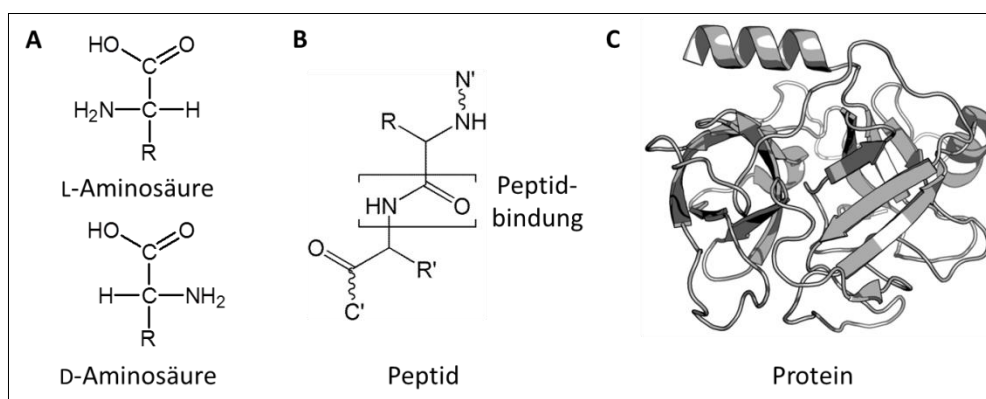
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
Ac	Acyl
ACN	Acetonitril
ADP	Alkalische D-Peptidase
Am	Amidinophenyl
AU	Absorptionseinheiten
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bz/Bzl	Benzyl/Benzoyl Rest
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSP	D-stereospezifische Proteasen
E	Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
eq.	äquivalent
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
Gp	Guanidinophenol
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
IQFS	intern gequenchtes fluorogenes Substrat
KG	Konservierungsgrad
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LMM	<i>low molecular mass</i>

LSP	L-stereospezifische Proteasen
M	Mimetikum
Me	Methyl
MES	( <i>N</i> -Morpholino)-ethanesulfonsäure
MTP	Mikrotiterplatte
NB	<i>nutrient broth</i>
$N_{\text{eff}}$	effektive Nukleophilkonzentration
NEM	<i>N</i> -Ethylmorpholin
Nu	Nukleophil
$OD_{600 \text{ nm}}$	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
p	Partitionswert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PbP	Penicillin-bindendes Protein
PDB	<i>Protein Database</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ph	Phenyl
PWMS	<i>protein weight matrix score</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i>
<i>p</i> NA	<i>para</i> -Nitroanilin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
$S_x/S_x'$	Substratbindungsart X
SC	<i>synthetic complete</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
StA	strukturelle Abdeckung
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1',3,3'-tetramethyluronium
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
$v_{\text{max}}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Wt	Wildtyp
YPD	<i>Yeast-Peptone-Dextrose</i>
Xaa	beliebige Aminosäure
Z	Benzoyloxycarbonyl



# Einleitung

In der Natur bilden  $\alpha$ -Aminosäuren neben Fetten, Zuckern und Ribonukleinsäuren einen der vier Grundbausteine für die Existenz von Leben. Bezogen auf ihre Struktur und die damit verbundene Funktionalität lassen sich je nach Organismus bis zu 20 ubiquitär verbreitete kanonische Aminosäuren unterscheiden, wobei alle mit Ausnahme der Iminosäure Prolin die gleiche Peptidrückgrat-Grundstruktur aufweisen (Voet & Voet, 2004). Weiterhin besitzen alle diese Aminosäuren bis auf Glycin an ihrem  $\alpha$ -C-Atom ein Chiralitätszentrum, weshalb sie sich anhand der Fischer-Projektion in L- und D-Aminosäuren klassifizieren lassen, wobei die D-Konfiguration einer Ausrichtung der Aminogruppe nach rechts (lat. *dexter*) entspricht (**Abb. 1.1 A**). Bei beiden Verbindungen handelt es sich um Stereoisomere, die sich per Definition nicht in ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden, sondern lediglich in der Drehung linear polarisierten Lichts (Fischer & Mouneyrat, 1900). Eine Ausnahme bilden zudem die Aminosäuren Isoleucin und Threonin, welche über ein zusätzliches Chiralitätszentrum in ihrer Seitenkette verfügen. Obwohl sie weniger abundant als ihre L-Stereoisomere scheinen, sind D-Aminosäuren in der Natur weit verbreitet. So sind eine Vielzahl selbiger bei Verbindungen in Boden-, Biofilm-, Gastrointestinaltrakt- und Fermentationsprodukt-Proben von Mikroorganismen nachgewiesen worden (Schieber *et al.*, 1999; Kolodkin-Gal *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2011; Vranova *et al.*, 2011). Ein Großteil dieser D-Aminosäuren ist dabei im Periplasma bzw. in extrazellulären Molekülen wie dem Peptidoglycan enthalten. So konnten bereits D-Alanin, D-Glutaminsäure, D-Serin und D-Lysin im naszierenden Stammpeptid des Peptidoglycans nachgewiesen werden (Arias *et al.*, 1999; Boniface *et al.*, 2006; Barreteau *et al.*, 2008). Im Allgemeinen spielen D-Aminosäuren für den Menschen eine eher untergeordnete Rolle. Lediglich bei Krankheiten wie Schizophrenie und bei Alterungsprozessen ist ein erhöhtes Auftreten von D-Asparaginsäure und D-Serin beobachtet worden (Fujii, 2002; Sacchi *et al.*, 2013).



**Abb. 1.1 Allgemeine Strukturen von Aminosäuren, Peptidbindungen und Proteinen.** Dargestellt sind die allgemeinen Stereoisomere von L- und D-Aminosäuren (**A**), deren Vernetzung unter Ausbildung einer Peptidbindung (**B**) und die Verbindung zur höheren Struktur eines Proteins am Beispiel des bovinen  $\beta$ -Trypsins (**C**) (Comicdarstellung in Graustufen, PDB-ID: 2AGE (Radisky *et al.*, 2006))

Die Verbindung zweier Aminosäuren über eine Amino- und eine Carbonsäurefunktionalität wird im Allgemeinen als Peptidbindung bezeichnet, wobei diese Bindung chemisch gesehen eine Säureamidbindung darstellt (**Abb. 1.1 B**). Einen Sonderfall der Säureamidbindung von Aminosäuren stellt die Bindung der  $\epsilon$ -Aminofunktion von Lysin und der Carboxyseitenkettenfunktion von Aspart oder Glutamat dar. In diesem Fall wird von einer Isopeptidbindung gesprochen. Im Gegensatz zur normalen Peptidbindung dient diese hauptsächlich der Quervernetzung von Proteinen (Hendrickx *et al.*, 2011).

Durch Aneinanderreihung mehrerer Aminosäuren mittels Säureamidbindungen entstehen höhere Verbindungen wie Peptide und Proteine. Dabei lässt sich der Übergang vom Peptid zum Protein je nach Definition zwischen 50 und 100 Aminosäuren festlegen. Während Peptide zumeist als bioreaktive Substanzen wie Hormone, Toxine oder Antibiotika agieren, erfüllen Proteine in Organismen eine Vielzahl von Funktionen (Gray *et al.*, 1988; Hancock, 1997; Pontiroli, 1998). So sind sie unter anderem in der Lage, sich an der Biokatalyse von biochemischen und stoffwechselphysiologischen Prozessen zu beteiligen, erfüllen zentrale Rollen in der Immunabwehr oder sind an der Zell-Zell-Interaktion und Strukturbildung beteiligt (Voet & Voet, 2004).

Viele dieser Prozesse sind im Allgemeinen gut untersucht, jedoch sind die jeweiligen detaillierten Mechanismen zumeist noch ungeklärt. Eine Möglichkeit, diese Fragestellungen anzugehen, bildet die gezielte Modifikation von Peptiden und Proteinen mit molekularen Sonden oder durch Veränderung der Struktur. So können auf molekularer Ebene Mechanismen, Funktionalitäten und Struktur-Wirkungsbeziehungen von Proteinen und Enzymen aufgeklärt werden. Die einfachste Form der Modifikation nach der chemischen Modifikation von Proteinen stellt dabei der Austausch potentiell beteiligter Aminosäuren durch gezielte Mutagenese dar. Mit Hilfe solcher Proteinvarianten ist es beispielweise möglich, im Rahmen eines Alanin-Scannings strukturelle und funktionelle Elemente in Proteinen zu identifizieren (Weiss *et al.*, 2000; Bian *et al.*, 2015). Eine weitere Form der Proteinmodifizierung stellt die Einführung kleinerer Moleküle wie zum Beispiel Förster-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Donoren bzw. -Akzeptoren dar. So lässt sich unter anderem die Interaktion von Proteinen oder deren Aggregation *in situ* in Zellkulturen verfolgen (Schuler & Eaton, 2008; Kitamura *et al.*, 2015). Die Biosynthese von Proteinen als *N*- bzw. *C*-terminale Proteinfusionstranskripte ist eine weitere, vor allem biotechnologisch eingesetzte Modifikationsform. So erhaltene Proteinvarianten werden zur Detektion und Aufklärung von Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen, zur Reinigung oder zur Erhöhung der Stabilität der Proteine gegenüber Degradierung genutzt (Kain *et al.*, 1995; Young *et al.*, 2012; Mendler *et al.*, 2015).

Für eine bessere und vor allem breitere Anwendung ist jedoch eine Optimierung der bisher bekannten Modifizierungsstrategien notwendig. Einen Überblick darüber und die Limitationen der einzelnen Methoden sind im Folgenden dargestellt.

## 1.1 Methoden zur Darstellung modifizierter Peptide und Proteine

Im Wesentlichen lassen sich die biochemisch und biotechnologisch angewandten Methoden zur Darstellung modifizierter Peptide und Proteine in vier Hauptstrategien diversifizieren. Dabei stellen die native Proteinbiosynthese und die chemische Darstellung Methoden dar, mit welcher Proteine *de novo* synthetisiert werden können; während post-translationelle Modifikationen und die nicht-ribosomale Proteinsynthese zumeist das Vorhandensein von Protein- bzw. Peptidfragmenten voraussetzt.

Die klassische native ribosomale Proteinbiosynthese bezeichnet die Generierung von Peptiden und Proteinen in Zellen (Lucaslen & Lipmann, 1971). In biologischen Systemen ist dieser Prozess zum Ausgleich des Verlustes von Proteinen durch Zellteilung, Proteinexport und -degradierung notwendig, oder um sich an wechselnde Bedingungen zu adaptieren und somit beispielsweise Wachstum oder das Überleben in der Umwelt zu ermöglichen (Schoenheimer, 1946; Hawkins, 1991; Mizushima & Klionsky, 2007). Dabei bildet die Translation den zentralen Prozess der Proteinbiosynthese, bei welchem Proteine korrespondierend zu ihrer genetischen Kodierung aus einzelnen Aminosäuren an den Ribosomen assembliert werden (Ibba & Soll, 1999). Die Transkription in mRNA und die anschließende Translation in Proteine durch sekundäre Elemente, wie Transkriptions- und Translationsfaktoren, sowie die Verfügbarkeit von tRNA wird dabei strengstens reguliert (Voet & Voet, 2004). Der Assemblierung gehen die ATP- bzw. GTP-abhängigen Prozesse der Beladung und des Transports der tRNA durch Aminosäure-tRNA-Synthetasen und Elongationsfaktoren voraus (Sprinzl, 1994; Ibba *et al.*, 1997). In der Praxis wird die Proteinbiosynthese genutzt, um zumeist rekombinant, kostengünstig und schnell eine Darstellung von Proteinen zu gewährleisten (Andersen & Krummen, 2002). Dabei reichen die verwendeten Strategien von der Nutzung bakterieller und eukaryotischer Zellen über die Biosynthese von Proteinen in zellfreien Biosynthesystemen bis hin zum Gebrauch von mit Viren transfektierten Insektenzellen (Wurm, 2004; Aucoin *et al.*, 2010; Overton, 2014). Je nach verwendetem System ergeben sich verschiedene Vor- und Nachteile. So liefern bakterielle Systeme wie *Escherichia coli* und *Corynebacterium sp.* vergleichsweise schnell und bei niedrigen Kosten sehr hohe Proteinausbeuten (Nakashima *et al.*, 2005; Sorensen & Mortensen, 2005). Im Gegenzug ist es schwer oder gar nicht möglich, auf diese Weise Proteine mit anspruchsvollen Sekundärstrukturelementen wie Disulfidbrücken und post-translationellen Modifikationen zu generieren (Baneyx & Mujacic, 2004). Um solche Probleme zu umgehen, werden zumeist eukaryotische Biosynthesysteme wie *Pichia pastoris* oder CHO-(*chinese hamster ovary*)-Zellen verwendet, welche ihrerseits eine anspruchsvollere Handhabung in Bezug auf Anzucht und benötigte Ausstattung aufweisen, was sich zumeist auf die Kosten und die Dauer der Biosynthesen auswirkt (Cereghino *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2012). Bei Betrachtung der Möglichkeiten zur Modifizierung von Proteinen ist die native Proteinsynthese stark limitiert. Zwar besteht die Möglichkeit, durch Manipulation auf DNA-Ebene die Proteinsequenz zu

verändern, jedoch ist selbiges aufgrund des genetischen Codes nur auf den Austausch gegen eine der 20 nativen Aminosäuren limitiert (Crick, 1968). Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, bietet der erweiterte genetische Code, mit welchem es möglich ist, durch Manipulation der Aminosäure-tRNA-Synthetasen artifizielle bzw. nicht-kanonische Aminosäuren in Proteine einzuführen (Barrell *et al.*, 1979; Budisa *et al.*, 1999; Bohlke & Budisa, 2014).

Zur Modifizierung von Peptiden und Proteinen mit komplexeren Verbindungen bzw. Aminosäureanaloga hat sich die chemische Synthese etabliert. Eines der ersten dargestellten Peptide ist das in Lösung synthetisierte Peptidhormon Oxytocin (Ressler & Du Vigneaud, 1954). Bedingt durch diese Art der Synthese ergeben sich jedoch Limitationen in der Größe der darzustellenden Peptide. Dieser Umstand änderte sich durch die 1963 von MERRIFIELD eingeführte Festphasen-Peptidsynthese (Merrifield, 1963). Eines der ersten vollsynthetisch dargestellten Proteine stellt die RNase A dar (Gutte & Merrifield, 1969). Die Vorteile der Festphasenpeptidsynthese liegen in ihrer Automatisierbarkeit und ihrer vergleichsweise hohen Effizienz. Als nachteilig erweisen sich jedoch Limitationen bedingt durch die Art und Länge der Zielsequenz. So ist es notwendig, aufgrund fehlender Regio- und Stereoselektivität zumeist aufwendige Schutzgruppenstrategien zu verwenden (Amblard *et al.*, 2006). Zudem steigt mit zunehmender Aminosäurekettenlänge auch die Gefahr der Entstehung von Rumpf-, Fehl- und Abbruchsequenzen. Eine Möglichkeit, solche ungewünschten Effekte zu minimieren, ist die Darstellung einzelner Peptidfragmente und deren anschließende chemoselektive Verknüpfung. Dabei reicht das verfügbare Methodenspektrum von Peptidrückgrat-manipulierenden Methoden über die native chemische Ligation bis hin zur Staudinger-Ligation (Staudinger & Meyer, 1919; Dawson *et al.*, 1994; Shao & Tam, 1995; Nilsson *et al.*, 2000). Mittels dieser Methoden ist es möglich, durch modulare Kombination einzelner, chemisch dargestellter Fragmente bzw. in Kombination mit rekombinant gewonnenen Fragmenten funktionsfähige Proteine darzustellen (Nilsson *et al.*, 2003). Neben der Möglichkeit der chemischen Modifizierung haben sich zahlreiche Methoden im Rahmen von Click-Chemie und bioorthogonaler Peptidmodifizierung etabliert (Kolb *et al.*, 2001; King & Wagner, 2014). Der Vorteil dieser Techniken ist, dass sie nicht zwingend auf artifiziell in die Zielstruktur eingeführte Click-Anker angewiesen sind, sondern bereits vorhandene Seitenkettenfunktionen von Aminosäuren nutzen können (Nguyen *et al.*, 2009).

Eine weitere Möglichkeit zur Einführung von neuartigen Funktionen in Proteine und Peptide bieten post-translationale Modifikationen. Hierzu zählen klassischerweise alle Veränderungen des Proteins in Sequenz, Struktur oder Funktionalität der Seitenketten im Anschluss an die native Proteinsynthese. Dabei stellen Abspaltungsreaktionen wie die Entfernung von Signalsequenzen oder die *N*-terminale Deformylierung die wichtigsten Formen der Sequenzveränderung dar (Adams, 1968; Luke *et al.*, 2009). Membraninsertion und auch Interaktion mit Proteinfaltung-beeinflussenden Proteinen hingegen bilden die wichtigsten Vertreter strukturverändernder Modifikationen (Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001; Park *et al.*, 2012). Die

für die Anwendung in der Biotechnologie sowie der medizinischen Forschung und damit für zukünftige Medikamente wohl bedeutendsten Ziele stellen Seitenkettenmodifikationen dar. So können zwölf der nativen Aminosäuren an ihrer Seitenkette mit anorganischen Modifizierungen wie Phosphorylierungen oder Iodierungen und organischen Gruppen wie Glykosylierungen, Myristoylierungen, Acetylierungen oder Methylierungen verändert werden, wobei dies in der Natur zumeist regulatorischen Funktionen dient (Voet & Voet, 2004; Bohlke & Budisa, 2014; Pisithkul *et al.*, 2015).

Eine Alternative zu den oben aufgeführten Darstellungsmöglichkeiten der Synthese und Modifizierung von Proteinen ist die nicht-ribosomale Peptidsynthese. Im Gegensatz zur ribosomalen Peptidsynthese verläuft hierbei die Darstellung von Peptiden komplett ohne Ribonukleinsäuren wie tRNA, mRNA und rRNA. Vielmehr findet die biokatalytische Assemblierung von Aminosäuren und -analoga sowie Peptiden und -fragmenten durch proteinogene Biokatalysatoren statt (Goswami & Van Lanen, 2015). Die hierbei auftretenden Reaktionen lassen sich in ATP/GTP-abhängige Reaktionen und in Transacylierungen unterteilen (**Abb. 1.2**).

Bei ATP/GTP-abhängigen Enzymen entstammt die aufgewendete Energie zur Bindungs-knüpfung aus der Hydrolyse von ATP oder GTP, wobei im Verlauf der Reaktion entweder aktivierte Acyladenylat- oder Acylphosphatintermediate gebildet werden. Natürlicherweise dienen diese Synthesen in Organismen der Darstellung von Sekundärmetaboliten wie den Toxinen Nikkomycin und Rhizocitin (Lauer *et al.*, 2001; Kino *et al.*, 2009). Für eine biotechnologische Nutzung ist die Transglutaminase 1 erwähnenswert, welche zur PEGylierung von Proteinen genutzt werden kann (Fontana *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu ATP/GTP-abhängigen Reaktionen sind Transacylierungsreaktionen zumindest nicht direkt auf externe Energieträger angewiesen. Im Verlauf der Reaktion wird bei diesen Biokatalysatoren im ersten Schritt eine Säureamid- oder Esterbindung unter Ausbildung eines tetrahedralen Intermediates nukleophil durch das aktive Zentrum des Enzyms angegriffen (Otto & Schirmeister, 1997; Hedstrom, 2002a). Im zweiten Schritt der Reaktion erfolgt der Angriff eines externen Nukleophils unter Bildung des Produktes. In der Natur entspricht das Nukleophil zumeist Wasser, weshalb diese Biokatalysatoren den klassischen Hydrolasen zuzuordnen sind und der Großteil der bekannten Reaktionen eher artifizieller Natur ist. Eine Ausnahme bilden Transpeptidasen, welche sowohl in der Gruppe der Serinproteasen (MEROPS-CLAN SE, Familie S11/S12), als auch in der Gruppe der Cysteinproteasen (MEROPS-Clan CL) auftreten (Mazmanian *et al.*, 2001; Pratt, 2008). Sie erfüllen zumeist essentielle Funktionen wie die Zellwandsynthese oder auch die Verankerung von Proteinen in der Zellwand.

Aufgrund ihrer Eigenschaften, stereoselektiv, regioselektiv und unter milden Bedingungen arbeiten zu können, werden zur Modifikation von Peptiden und Proteinen häufig Transacylierung-katalysierende Biokatalysatoren angewendet (Bordusa, 2002). Diese Enzyme

haben zudem das Potential, langkettige Peptidfragmente miteinander zu verbinden, was in der Anwendung eine Kombination aus chemischer und rekombinanter Fragmentsynthese erlaubt (Cеровsky & Bordusa, 2000). Als Nachteilig erweist sich jedoch der Mechanismus, welcher zumeist die Hydrolyse und weniger die Bildung von Peptiden favorisiert. Daher werden diese Biokatalysatoren bzw. ihr Reaktionsmechanismus manipuliert und/oder kommen optimierte Substrate zur Anwendung. Eine Übersicht hierüber ist im Folgenden aufgeführt (**Abb.1.2**).

ATP/GTP-abhängige Reaktionen		Enzymgruppe	Enzym	Produkt	Referenz
Acyl-Adenylat-bildende Enzyme	nicht-ribosomale Peptidsynthetasen		Thyrocidin-Synthetase I	Dipeptide	Dieckmann, 2001
			Aminolysin A	Dipeptide	Usuki, 2010
ATP/GTP-nutzende Enzyme	Transglutaminasen, D-Ala-D-Ala-Ligasen		Transglutaminase 1	PEGylierung	Fontana, 2008
			TbIF (D-Ala:D-Ala-Ligase)	Tabtoxin	Kinscherf, 2005
		Aminosäureligasen		NikS (L-Xaa-Ligase)	Nikkomycin
	RizA (L-Arg:Xaa-Ligase)		Rhizocticin	Kino, 2009	
Transacylierung		Enzymgruppe	Enzym	Produkt	Referenz
α/β Hydrolasen Superfamilie	Esterasen		Porcine-Liver-Esterase	Dipeptide	West, 1987
			<i>B. mycooides</i> AEH	Dipeptide	Sugihara, 2001
Serinproteasen	Lipasen		Porcine-Pancreas-Lipase	Dipeptide	So, 1998
			Lipase B	β-Peptide	Li, 2006
		Chymotrypsin-Faltungstyp		V8-Protease	Fragmentkond.
	α-Chymotrypsin		Tripeptide	Moriyama, 1977	
Cysteinproteasen	D-Ala-D-Ala-Transpeptidasen		Alkalische D-Peptidase	Fragmentkond.	Wehofsky, 2008
			<i>B. subtilis</i> pbp 1a	Dipeptide	Lebar, 2014
		Transacylasen		CapS/CapW	Aminocaprolactame
	BioC/BioH		Pimeloyl-ACP	Lin, 2010	
Cysteinproteasen	Endopeptidasen		Clostripain	Peptide	Bordusa, 1997
			Papain	Isopeptide	Gunther, 2000
		Transpeptidasen (Clan CL)		Sortase	Fragmentkond.
	YbiS Protein		Transpeptidierung	Magnet, 2007	

**Abb. 1.2 Überblick über Katalysatoren der nicht-ribosomalen Peptidsynthese.** Dargestellt sind die beiden Hauptreaktionen der nicht-ribosomalen Peptidsynthese, die ATP/GTP abhängigen Reaktionen (in Rot) und die Transacylierungen (in Blau). Zudem sind die einzelnen, den Reaktionen zugehörigen Biokatalysatoren aufgeführt und klassifiziert (Enzymfamilie, Enzymgruppe sowie ein Enzymvertreter und dessen Produktbildung). Modifiziert nach GOSWAMI (GOSWAMI & VAN LANEN, 2015).

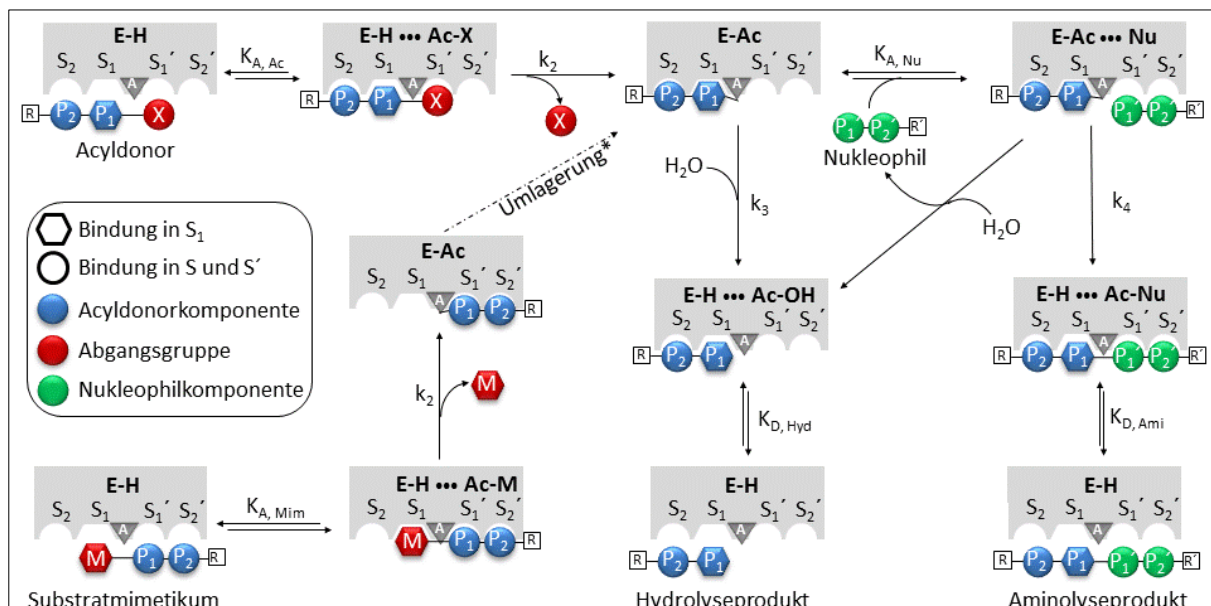
## 1.2 Protease-katalysierte Synthese von Peptiden und Proteinen

In ihrer Funktion als Biokatalysatoren sind Proteasen nicht nur in der Lage, die hydrolytische Spaltung von Peptiden zu katalysieren, sondern vermitteln auch die Rückreaktion, was allgemein als Aminolyse bezeichnet wird (van't Hoff, 1898; Arnett *et al.*, 1951). Erste Ansätze zur praktischen Umsetzung dieser Theorie konnten bereits 1937 von Max Bergmann mit der

Synthese von Z-Glycyanilid gezeigt werden (Bergmann & Fraenkel-Conrat, 1937). Da das Gleichgewicht dieser Reaktion aufgrund der energetisch stabilen Produkte auf reaktionseitig auf der Hydrolyse liegt, ist eine Manipulation des Enzyms, des Substrates oder der Reaktionsbedingungen notwendig. Die beiden verwendeten Hauptstrategien sind die thermodynamisch kontrollierte Peptidsynthese und die kinetisch kontrollierte Peptidsynthese (Jakubke *et al.*, 1985; Barbas *et al.*, 1988). Klassische Beispiele für die thermodynamisch kontrollierte Peptidsynthese stellen Reaktionen in organisch-wässrigen Lösungsmitteln oder in Wassermimetika dar (Homandberg *et al.*, 1978; Kitaguchi & Klibanov, 1989). Zudem zählen Reaktionen, bei welchen das Produkt durch Präzipitation, Komplexbildung oder Ausfällung der Reaktion entzogen wird, zu den thermodynamisch kontrollierten Reaktionen (Isowa *et al.*, 1979; Jakubke *et al.*, 1985). Ein Vorteil dieser Reaktionen liegt in der Verwendung von nicht aktivierten Reaktanden, wie zum Beispiel freien Termini von Aminosäuren und zudem in der Tatsache, dass alle Arten von Proteasen für diese Synthesen genutzt werden können. Als nachteilig erweisen sich hingegen die niedrige Geschwindigkeit in Kombination mit hohen Enzymkonzentrationen bei oft niedrigen Produktausbeuten (Bordusa, 2002). Um diese Limitationen zu umgehen, bildet die kinetisch kontrollierte Peptidsynthese eine Alternative. Sie benötigt im Gegensatz zur thermodynamisch kontrollierten Peptidsynthese geringere Biokatalysatorkonzentrationen, bedingt aber im Gegenzug zumeist die Verwendung von aktivierten Carboxylkomponenten wie Aminosäureestern und -thioestern (Schellenberger *et al.*, 1994; Bordusa, 2002). Dabei besteht die Notwendigkeit der Bildung eines Acyl-Enzymintermediates während der Reaktion, weshalb diese Art der Peptidsynthese auf Serin- und Cysteinproteasen limitiert ist (Fastrez & Fersht, 1973; Guttilla *et al.*, 2009). Gleichzeitig erlaubt jedoch eben diese Tatsache, dass zumindest intermediär höhere Syntheseausbeuten erreicht werden (Jakubke *et al.*, 1985).

Diese, lediglich intermediär erreichten hohen Ausbeuten, liegen in der Tatsache begründet, dass die kinetisch kontrollierte Peptidsynthesereaktion in direkter Konkurrenz zur Hydrolyse steht, was durch den Reaktionsmechanismus von Serin- und Cysteinproteasen deutlich wird (**Abb. 1.3**). So finden initial die Assoziation des Substrates und der nukleophile Angriff des aktiven Zentrums auf die zu spaltende Peptidbindung statt. In weiterer Folge kommt es zur Bildung des Michaeliskomplex (**E-H...Ac-X**) und nach Dissoziation der C-terminalen Abgangsgruppe zur Ausbildung der tetrahedralen Intermediates (**E-Ac**). An diesem Punkt der Reaktion diversifizieren sich Hydrolyse und Aminolyse. Im Fall der Hydrolyse zu einem nukleophilen Angriff von Wasser auf das Acyl-Enzymintermediat, in dessen Folge es zur Bildung eines zweiten Michaeliskomplex (**E-H...Ac-OH**) kommt. Als Ergebnis kommt es letztlich zur Freisetzung des N-terminalen Peptides (Hydrolyseprodukt) und der Regeneration des Biokatalysators (Hedstrom, 2002a). Im Fall der Aminolyse assoziiert initial ein Peptid an das Acyl-Enzymintermediat (**E-Ac...Nu**). Im Folgenden kann es wiederum zu

einem nukleophilen Angriff von Wasser kommen, was zur Hydrolysereaktion führen würde. Alternativ greift die reaktive Gruppe des Peptides, in der Regel die *N*-terminale Aminofunktion, den Komplex nukleophil an. In diesem Fall bildet sich in der Folge der zweite Michaeliskomplex (**E-H...Ac-Nu**), welcher zur Bildung des finalen Aminolyseproduktes führt (Fastrez & Fersht, 1973). Da die Reaktion kinetisch kontrolliert erfolgt, sollten für eine möglichst hohe Ausbeute einige Parameter erfüllt sein. So sollte die Bildung des Acyl-Enzymintermediates ( $k_2$ ) schneller sein, als die Umsetzung durch die Aminolyse ( $k_4$ ) und die Hydrolyse ( $k_3$ ). Zudem ist es für eine hohe Ausbeute von Vorteil, wenn die Geschwindigkeit der Nukleophil-Assoziation zum Michaeliskomplex ( $k_4 \cdot [\text{Nukleophil}]$ ) höher ist, als die Geschwindigkeit der Hydrolyse ( $k_3 \cdot [\text{Wasser}]$ ). Aus diesem Grund hat sich die Anwendung von aktivierten Carbonsäurekomponenten wie Estern und Thioestern für die kinetisch kontrollierte Peptidsynthese etabliert, da selbige die Kernbedingung  $k_2 \gg (k_3 + k_4)$  erfüllen (Jakubke *et al.*, 1985).



**Abb. 1.3 Darstellung der kinetisch kontrollierten Synthese von Peptidfragmenten.** In der initialen Phase bindet Acylidonorkomponente/Substratmimetikum (**M**) (blau und rot) an eine Serin- oder Cysteinprotease (Grau, **E-H** freies Enzym). Nach Assoziation unter Ausbildung des Michaelis-Komplex (**E-H...Ac-X/ E-H...Ac-M**), kommt es zu Abspaltung der Abgangsgruppe (rot) – im Fall der Verwendung eines Substratmimetikums zur Umlagerung – und abschließend zur Ausbildung des Acyl-Enzym-Intermediates (**E-Ac**). Ausgehend von selbigem sind nun zwei Reaktionen denkbar. Der nukleophile Angriff von Wasser (**H<sub>2</sub>O**) führt unter Ausbildung des zweiten tetrahedralen Intermediates (**E-H...Ac-OH**) zur anschließenden Dissoziation des Hydrolyseproduktes und zur Regeneration des Enzymes (**E-H**). Die zweite denkbare Reaktion stellt der Angriff einer organischen Nukleophil-Komponente wie einem Peptid dar (grün). Hierbei kommt es zur Ausbildung des Acylenzym-Nukleophil-Komplexes (**E-H...Nu**), welcher in der Folge zu einem zweiten tetrahedralen Intermediat (**E...Ac-Nu**) unter Freisetzung des Aminolyseproduktes reagieren kann. Alternativ ist auch eine Nebenreaktion des **E-H...Nu** mit Wasser unter Ausbildung des **E-H...Ac-OH** denkbar. / Zusätzlich sind Geschwindigkeitskonstanten (**k**) und Gleichgewichtskonstanten (**K**) der einzelnen Reaktionen verzeichnet. Die Nomenklatur der Substratbindungsstelle orientiert sich an SCHECHTER & BERGER (Schechter & Berger, 1967)

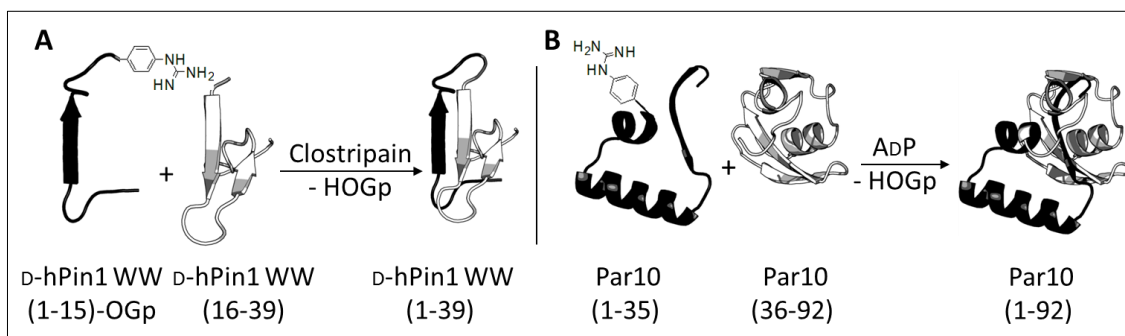


Trotz dieser Anpassungen durchlaufen die meisten Reaktionen jedoch ein kinetisches Produktmaximum, was darin begründet ist, dass die enzymatische Aktivität gegenüber Estersubstraten bei den meisten Proteasen höher ist, als deren enzymatische Aktivität gegenüber Peptiden (Bender *et al.*, 1964). Dies hat zur Konsequenz, dass die Bildung des Aminolyseproduktes bis zum Verbrauch der Acyldonorkomponente stark begünstigt ist. Nach vollständigem Verbrauch selbiger treten jedoch sekundäre Hydrolyseereignisse auf. Diese Reaktionen haben meist eine Spaltung des Aminolyseproduktes an der Knüpfungsstelle, bedingt durch die Spezifität der Protease und die Reversibilität der Reaktion, zur Folge (Whitaker & Bender, 1965; Jakubke *et al.*, 1985). Eine Möglichkeit, dieses zentrale Problem während der Reaktion zu umgehen, stellt die Verwendung von Substratmimetika dar (**Abb. 1.3**). Diese Substrate zeichnen sich durch eine Umlagerung der Abgangsgruppe in die primäre Substratbindungsstelle aus, was zur Folge hat, dass selbige invers in die jeweilige Protease einbinden (**E-H•••Ac-M**). Nach Spaltung der Bindung und Freisetzung der Mimetikaabgangsgruppe kommt es zur Bildung des tetrahedralen Intermediates (**E-Ac**) und der Fortsetzung der Reaktion zur Hydrolyse oder Aminolyse (Thormann *et al.*, 1999; Bordusa, 2002). Ein zusätzlicher Vorteil bei der Verwendung von Substratmimetika ist, dass auch unspezifische Acylgruppen übertragen werden können. Dies hat zur Folge, dass für die Sekundärhydrolyse unzugängliche Reaktionsprodukte gebildet werden (Schellenberger *et al.*, 1991; Wehofsky *et al.*, 2003).

Jedoch kann selbst mit Hilfe dieser Strategie nicht verhindert werden, dass sekundäre spezifische Hydrolyseereignisse anderweitig im Molekül auftreten. Um dies zu verhindern, wurden weitere Strategien wie das *Medium Engineering* oder *Enzyme Engineering* entwickelt. Mit ersterem Verfahren wird versucht, durch Manipulation der Umgebung wie der Verwendung von wässrig-organischen Lösungsmittelsystemen oder das Arbeiten in gefroren-wässrigen Lösungen aus der Reaktion auszuschließen (Kuhl & Jakubke, 1990; Wehofsky *et al.*, 2000). Beim *Enzyme Engineering* hingegen rückt der Biokatalysator selbst in den Fokus der Verbesserung. Eine Möglichkeit, dies zu bewerkstelligen, stellt die chemische Modifizierung jener Aminosäuren dar, welche sich zumeist an der Oberfläche befinden und/oder katalytische Relevanz besitzen (Nakatsuka *et al.*, 1987; Itoh *et al.*, 1997). Als zusätzliche Variante zur Optimierung von Biokatalysatoren hat sich außerdem die gelenkte Evolution mittels gerichteter oder zufallsbasierter Mutagenese etabliert (Jackel *et al.*, 2008). Damit können grundlegende Eigenschaften von Enzymen wie Aktivität, Spezifität oder Reaktivität optimiert und verändert werden (Dorr *et al.*, 2014).

Eine vierte Möglichkeit zur Umgehung unerwünschter hydrolytischer Ereignisse ist die Fragmentligation unter Ausnutzung der Stereospezifität des Biokatalysators, welche in der Folge keine Hydrolyse des entstehenden Produktes zeigt. Eine der ersten Anwendungen dieser Art erfolgte 2003 von WEHOFSKY *et al.*, welche mit Hilfe der L-Aminosäure-spezifischen Protease Clostripain und Substratmimetika-vermittelt erfolgreich zunächst D-Peptide und

später die WW-Domäne des humanen Pin1 in *all*-D-Konfiguration darstellen konnten (**Abb. 1.4 A**) (Wehofsky *et al.*, 2003). Die so dargestellten Produkte erwiesen sich als hydrolytisch stabil gegenüber dem verwendeten Biokatalysator. Im Jahr 2008 wurde dieser Ansatz erfolgreich auf *all*-L-Parvulin 10 aus *E. coli* übertragen (**Abb. 1.4 B**). Als Biokatalysator für diese Fragmentligation wurde die alkalische D-Peptidase AdP aus *B. cereus* verwendet, wobei sich abermals eine Produktstabilität gegenüber hydrolytischen Prozessen der Protease zeigte (Wehofsky *et al.*, 2008). Der breiteren Anwendung des Konzeptes der Nutzung D-Aminosäure-spezifischer Proteasen zur katalysierten Synthese von Peptiden und Proteinen steht jedoch die bislang unerforschte Substratspezifität der vorhandenen Biokatalysatoren entgegen.



**Abb. 1.4 Beispiele der stereospezifisch kontrollierten Fragmentligation.** Dargestellt sind die Kristallstrukturen der Fragmentligationen der *all*-D-WW-Domäne von humanem Pin1 mit Hilfe der L-stereospezifischen Protease Clostripain (**A**) und die Fragmentligation von *E. coli* Parvulin 10 mit Hilfe der D-stereospezifischen Protease AdP (**B**). / Die einzelnen Fragmente sowie die entstehenden Konstrukte sind als Comic dargestellt, zudem sind die Guanidinophenylester (HOGp) verzeichnet / PDB-ID: 1I6C, hPin1 WW (Wintjens *et al.*, 2001) bzw. 1JNS, Par10 (Kuhlewein *et al.*, 2004)

### 1.3 D-Aminosäure spezifische Enzyme

Neben der oben aufgeführten Nutzung von D-Aminosäure-spezifischen Hydrolasen in der Synthese von *all*-L-Peptiden spielen D-Aminosäuren und Enzyme, welche mit selbigen interagieren, in vielen Bereichen der Natur eine wichtige Rolle. Wie eingangs beschrieben treten D-Aminosäuren – vor allem D-Alanin, D-Serin und D-Glutamat – nahezu ubiquitär in allen Organismen auf. Hauptsächlich sind diese D-Aminosäuren in Bacteria im naszierenden Stammpeptid des Peptidoglycan lokalisiert, während sie in Vertebraten in Hirn- und Drüsengewebe auftreten und von Pilzen zumeist in Form höher strukturierter Substanzen sekretiert werden (Hoffmann *et al.*, 1994; Homma *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 1997; Scheffers & Pinho, 2005). Die Darstellung dieser D-Aminosäuren erfolgt in den Organismen zumeist durch Racemisierungsprozesse ausgehend von L-Aminosäuren. Dementsprechend werden die Biokatalysatoren in diesen Reaktionen als Racemasen bezeichnet, wobei selbige in Kofaktor-abhängige und -unabhängige klassifiziert werden (Yoshimura & Esak, 2003). Einen der häufigsten Kofaktoren stellt Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) dar, welches beispielsweise in der D-Alanin-Racemase DadB aus *Salmonella thyphimurium* oder in der D-Serin-Racemase

aus *Bombyx mori* zu finden ist (Wasserman *et al.*, 1984; Uo *et al.*, 1998). Bekannte Beispiele für Kofaktor-freie Racemasen sind die D-Glutamat-Racemase aus *E. coli*, welche allosterisch durch UDP-MurNAc-L-Ala reguliert wird, oder die D-Aspart-Racemase aus dem Archaeon *Desulfurococcus* (Ho *et al.*, 1995; Matsumoto *et al.*, 1999).

In der Biotechnologie hingegen hat sich Darstellung von D-Aminosäuren mittels manipulierter Organismen bewährt. Häufig werden hierbei D,L-Hydantoin-umsetzende Bakterienstämme verwendet, die unter Ausnutzung des Stoffwechsels (Imidolyse und Carbamoylierung) im großen Maßstab D-Aminosäuren darstellen können (Lee *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2000). Eine weitere Gruppe von D-Aminosäuren-akzeptierenden Enzymen stellen Aminosäureoxidasen dar. Diese katalysieren die Umsetzung von D-Aminosäuren zu  $\alpha$ -Ketosäuren, Ammoniak und Wasserstoffperoxid und treten zumeist in höheren Organismen auf, wobei sie vermutlich der Detoxifikation gegenüber D-Aminosäuren dienen (Krebs, 1935; D'Aniello *et al.*, 1993). In diesem Kontext konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von D-Aspartat und Alzheimer gezeigt werden (Shapira *et al.*, 1988). Eine ähnlich toxische Rolle von D-Aminosäuren ist auch in Bakterien bekannt. So kann beispielsweise freies D-Tyrosin und D-Tryptophan in *B. subtilis* auf tRNA<sup>Tyr</sup> beladen werden, was zur Folge hat, dass fälschlicherweise in Proteine inkorporiert wird und somit zu Fehlfaltungen und -funktionen führen kann (Leiman *et al.*, 2015). Eine weitere Substanzklasse, welche D-Aminosäuren beinhaltet, sind antibakterielle Verbindungen. Wichtige Vertreter stellen hierbei Gramicidine, Vancomycin und Penicilline oder das artifizielle „Antibiotikum“ *all*-D-Melittin dar (Fleming, 1929; Hotchkiss & Dubos, 1940; Fairbrother & Williams, 1956; Wade *et al.*, 1990). Dabei ist die Gruppe der Penicilline, welche zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehören, die wohl am besten untersuchte und charakterisierte Antibiotikagruppe. Diese Substanzen werden in verschiedenen *Penicillium*-Stämmen gebildet, wobei die Synthese in mehreren Schritten (Kondensierungen, Zyklisierung, Transamidierung) erfolgt (Schofield *et al.*, 1997). Als Grundkomponenten von Penicillin konnten L- $\alpha$ -Aminoadipinsäure, L-Cystein und L-Valin, welches in einer vorgelagerten Epimerisierung zu D-Valin umgewandelt wird, identifiziert werden (Baker & Lonergan, 2002). Die antibiotische Wirkung von Penicillin auf die Zellwandbildung von Bakterien ist durch die beteiligten Proteine begründet, welche Penicillin als Substrat erkennen und mit ihm einen irreversiblen Acyl-Enzym-Inhibitor-Komplex bilden und gehemmt werden (Fisher *et al.*, 2005). Entsprechend dieser Eigenschaft werden diese Enzyme als Penicillin-bindende-Proteine (PbP) bezeichnet (Pratt & McLeish, 2010). Weiterhin werden sie aber auch als DD-Peptidasen bezeichnet, was ihre eigentliche Funktion, nämlich die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen D-Alanin und D-Alanin im naszierenden Peptidoglycan-Stammpeptid widerspiegelt (Tipper & Strominger, 1965). DD-Peptidasen sind Enzyme die allesamt eine  $\beta$ -Lactamase-ähnliche Faltung besitzen. Sie gehören zu den Serinproteasen mit einer katalytischen Duade bestehend aus Lysin und Serin und besitzen, entsprechend ihrer zugehörigen Subgruppe, verschiedene konservierte

Sequenzmotive wie Tyr-Xaa-Asn, Ser-Xaa-Asn oder Lys-Thr-Gly (Pratt & McLeish, 2010). Allen Mitgliedern gemein ist, dass sie hydrolytische Aktivität gegenüber D-Aminosäure-haltigen Substraten aufweisen (**Tab. 1.1**). Auffällig ist dabei, dass innerhalb dieser Enzymgruppe die Art der hydrolytischen Aktivität zu variieren scheint. So gibt es scheinbar reine Esterasen/Transpeptidasen, Aminosäureamidasen sowie Peptidasen, von denen die Mehrheit eine Spezifität für D-Alanin und D-Phenylalanin aufweist (Sauvage *et al.*, 2008). Bei einer Betrachtung der Gruppe der Peptidasen selbst ist auffällig, dass die meisten hierbei Vertreter der Exopeptidasen sind (**Tab. 1.1**). Dies bedeutet, dass sie Peptide und Proteine entweder vom *N*-Terminus oder vom *C*-Terminus proteolytisch angreifen und spalten können. Lediglich bei der alkalischen D-Peptidase, welche 1996 von ASANO *et al.* isoliert wurde, konnte eine endopeptolytische Aktivität nachgewiesen werden (Asano *et al.*, 1996). Einer der Hauptgründe liegt darin begründet, dass sich bisherige Screening-Versuche zur Detektion von D-Aminosäure spezifischer Proteasen zumeist als sehr aufwendig und kostenintensiv erwiesen haben.

**Tab. 1.1 Übersicht über Hydrolasen verschiedener Funktionalität mit PbP-/ $\beta$ -Lactamasefaltung.** Aufgeführt sind die Namen der Enzyme, der Herkunftsorganismus, ihr primäre Spezifität sowie ihre Funktionalität hinsichtlich ihrer hydrolytischen Aktivität.

Enzymname	Organismus	Spezifität	Funktion	Referenz
Alkalische-D-Peptidase	<i>B. cereus</i>	(D-Phe) <sub>4</sub>	Endopeptidase	Asano, 1996
D-Amino-peptidase	<i>O. anthropi</i>	D-Ala-pNA D-Ala-D,L-Ala	Amino-peptidase	Asano, 1989b
D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase	<i>Streptomyces</i> R61	Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala	Carboxypeptidase	Kelly, 1985
D-Aminosäureamidase	<i>O. anthropi</i>	D-Phe-NH <sub>2</sub>	Aminosäureamidase	Asano, 1989a
EstB	<i>B. gladioli</i>	D-Ala-OX	Carboxylesterase	Petersen, 2001
Simvastatin-Synthase LovD	<i>A. terreus</i>	Monacolin-J-säure	Transesterase	Kennedy, 1999
PbP 4	<i>L. monocytogenes</i>	D-Ala	Transpeptidase	Jeong, 2013
Pab87-Peptidase	<i>P. abyssi</i>	D-Ala-pNA	Amino-peptidase	Delfosse, 2009
GC1 $\beta$ -Lactamase	<i>E. cloacae</i>	Penicillin	$\beta$ -Lactamase	Then, 1988

#### 1.4 Techniken zur Detektion und Evolution von proteolytischer Aktivität

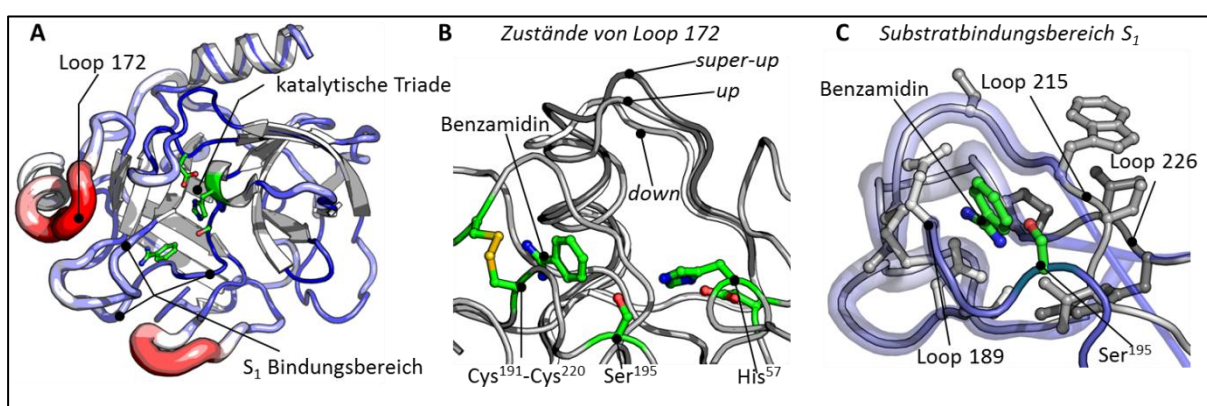
Im Laufe der Zeit wurden zur Detektion von D-Aminosäure-spezifischen Hydrolasen eine Reihe zumeist eher simplerer Substrate entwickelt und verwendet. Einen der ersten Ansätze stellte das Wachstum auf einem selektiven Medium dar. So wurde beispielsweise die D-Aminoacylase-Aktivität in *Pseudomonas* durch Wachstum in Medien mit Benzoyl-D-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle entdeckt (Kameda *et al.*, 1952). Ein anderes Beispiel für diesen Ansatz lieferte die Isolation von *Raoultella ornithinolytica*, welcher das Substrat (D-Aspartat)<sub>8</sub> als Kohlenstoffquelle nutzte (Asano *et al.*, 2001). Als nachteilig bei solchen Methoden erwies sich jedoch die Tatsache, dass zwar Aktivität im Organismus nachgewiesen

wurde, diese jedoch nicht direkt oder nur sehr umständlich einem Enzym zugeordnet werden konnte. Dies änderte sich durch die Verwendung von Substraten, welche zur direkten Detektion genutzt werden können. Ein Beispiel hierfür ist D-Alanin-pNA, welches zur Identifizierung und Isolation zweier D-Aminopeptidasen aus *O. anthropi* genutzt werden konnte (Fanuel *et al.*, 1999). Eine andere Methode ist die Nutzung eines Trübungsassays. Hierbei kann zum Beispiel (D-Phenylalanin)<sub>4</sub> genutzt werden. Natürlicherweise ist dieses Substrat in wässrigem Milieu löslichkeitsbedingt trüb, jedoch tritt in Folge hydrolytischer Aktivität wie zum Beispiel durch ADP eine Klärung des Substrates ein (Asano *et al.*, 1996). Eine andere Möglichkeit, die bisher jedoch noch nicht zur Isolation von Biokatalysatoren genutzt wurde, stellt die Verwendung von FRET-Substraten zur Identifizierung und Vorhersage von pathogenen Organismen dar (Kaman *et al.*, 2013a; Kaman *et al.*, 2013b).

Mit oben genannten Substraten ist es zwar möglich, die Aktivität D-Aminosäure-spezifischer Enzyme zu detektieren, jedoch sind die Isolation und der damit verbundene Anspruch an Laboratorien und Techniken eine enorme Herausforderung. Eine Alternative zur Isolierung potentiell wertvoller D-Aminosäure-spezifischer Proteasen aus natürlichen Quellen stellt die gelenkte Evolution von bereits vorhandenen und dementsprechend gut charakterisierten Biokatalysatoren dar. Dabei wird der Biokatalysator ähnlich der natürlichen Evolution in wiederkehrenden Zyklen mittels Mutagenese, Biosynthese, Screening und Selektion auf seine gewünschte Eigenschaft hin optimiert (Reetz, 2011). Bedingt durch die Sequenz des zu optimierenden Biokatalysators werden verschiedene Ansprüche an das Gesamtsystem der gelenkten Evolution gestellt. So folgt beispielsweise die maximale Diversität – die Anzahl der Enzymvarianten (N) in Abhängigkeit der zu randomisierenden Positionen (M) und der Primärsequenz des zu optimierenden Biokatalysators (X) – dem Algorithmus  $N = 19^M X! / (X-M)! M!$  (Reetz, 2011). Dieser Algorithmus beschreibt die Anzahl der Varianten, welche in klassischen evolutiven Ansätzen wie der Randomisierung mittels Chemikalien, UV-Licht, Mutatorstämmen oder auch bei PCR-Ansätzen wie der *error-prone*-PCR zu durchmustern wären (Henke & Bornscheuer, 1999; Neylon, 2004; Muteeb & Sen, 2010). Um die Anzahl der redundanten Varianten zu reduzieren, welche bei diesen Techniken schon nach wenigen Zyklen entstehen, wurden vereinfachende und optimierende Techniken entwickelt. Eine dieser Methoden ist die Sättigungsmutagenese (Reetz *et al.*, 2006). Hierbei werden nur bestimmte Positionen im Zielprotein mutiert, was die Anzahl der zu *analysierenden* Varianten erheblich verringert (Patrick *et al.*, 2003). Die Mutationen werden dabei durch entartete Primer bzw. Nukleotide wie NNK (N: Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin (T) / K: Guanin, Thymin) eingeführt (Reetz & Carballeira, 2007). Durch Auswahl anderer Kombinationen ist es zudem möglich, nur aromatische, aliphatische oder polare Aminosäuren an den gewünschten Positionen zu generieren (Nov & Segev, 2013). Die Auswahl der Positionen hingegen erfolgt rational nach Gesichtspunkten der Konservierung einzelner Residuen und Erkenntnissen aus der Literatur (Pavelka *et al.*, 2009b). Nach

Darstellung der Bibliothek auf DNA-Ebene erfolgt die Biosynthese bzw. Präsentation der Proteinvarianten und das Durchmustern der Proteinbibliotheken. Hierbei wurden in Abhängigkeit des eigentlichen Screenings und Selektionssystems verschiedene Methoden wie der *Hefen-Display*, *Phagen-Display* oder *Bakterien-Oberflächen-Display* entwickelt (Smith, 1985; Boder & Wittrup, 1997; Kenrick & Daugherty, 2010). Aber auch eine direkte Biosynthese in eu- und prokaryotischen Wirtszellen mit anschließendem Screening nach der gewünschten Eigenschaft ist möglich.

Mit einem geeigneten Selektions- und Screening-System wäre es möglich, die Suche nach natürlichen D-Aminosäure-spezifischen Biokatalysatoren zu umgehen. Als Grundlage für diesen Ansatz wird in dieser Arbeit das Modellsystem Trypsin genutzt. Dieses erstmals 1876 durch KÜHNE beschriebene Protein ist eine Serinprotease mit einer hohen Spezifität gegenüber basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin (Kühne, 1867; Rawlings *et al.*, 2012). Trypsin selbst verfügt über eine katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Histidin<sup>57</sup>, Aspartat<sup>102</sup> und Serin<sup>195</sup>, wohingegen die S<sub>1</sub>-Substratbindungsortspezifität gegenüber basischen Aminosäureseitenkettenfunktionen von Lysin und Arginin hauptsächlich durch das saure Aspartat<sup>189</sup> determiniert wird, welches sich am Boden des S<sub>1</sub>-Substratbindungsortes befindet, (Hedstrom, 2002b). Der Substratbindungsort selbst wird durch die drei nach ihrer ersten Aminosäureposition benannten *Loops* 189, 215 und 226 gebildet (**Abb. 1.5 C**) (Ma *et al.*, 2005). Als Modellprotein wurde anionisches Rattentrypsin bereits genutzt. So wurde bedingt durch die ähnliche Tertiärstruktur von Trypsin im Vergleich zu Chymotrypsin durch rationales Enzymdesign des Substratbindungsbereiches und angrenzender Bereiche die Spezifität erfolgreich zu Phenylalanin geändert (Hedstrom *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurde in der Vergangenheit erfolgreich die Funktionalität des Enzymes geändert.



**Abb. 1.5 Allgemeine Struktur von SSAI-Trypsin.** Dargestellt ist die gemittelte Struktur der *super-up*-, *up*- und *down*-Struktur von SSAI-Trypsin (**A**, *putty*, Farbverlauf von blau (starr) nach rot (flexibel)). Des Weiteren ist der Bereich um Loop 175 mitsamt der möglichen drei Loop-Zustände (**B**, *super-up* (dunkelgrau), *up* (grau) und *down* (hellgrau)), sowie der Substratbindungsbereich mit den Loops 189, 215, 226 (**C**, gemittelte Struktur) dargestellt. Zur besseren Orientierung sind jeweils die katalytische Triade sowie Benzamidin (Stick, grün) und die Struktur des *up*-Zustands von SSAI-Trypsin dargestellt. / PDB-ID: 1V2U, 1V2V, 1V2W (Rauh *et al.*, 2004)

So gelang es, die Spezifität des Enzymes durch rationales Enzymdesign hin zu einer Tyr-Arg-His-Spezifität zu ändern. Diese Tyrosin-spezifische Trypsinvariante, welche auch unter dem Namen Trypsiligase bekannt ist, konnte im Folgenden erfolgreich zur N- und C-terminalen Modifikation von Peptiden und Proteinen genutzt werden (Liebscher *et al.*, 2014a; Liebscher *et al.*, 2014b). Neben diesen Untersuchungen wurde auch versucht, Bindungsspezifitäten anderer Proteasen wie Faktor Xa auf das Modellsystem Trypsin zu übertragen. In diesen Arbeiten stand vor allen Dingen der *Loop* 175 im Fokus, welcher die S<sub>3</sub>- bzw. S<sub>4</sub>-Spezifität determiniert (Hedstrom *et al.*, 1994b; Rauh *et al.*, 2004). Eine Variante mit Aminosäureaustauschen im *Loop* 175 stellt SSAI-Trypsin dar (**Abb. 1.5**). Diese Trypsinvariante trägt im Bereich von *Loop* 175 die Mutationen Y172S, P173S, G174A und K175I, was zur Folge hat, dass dieser Bereich eine erhöhte Flexibilität aufweist (**Abb. 1.5 A**) (Rauh *et al.*, 2004). Als ursächlich hierfür konnten drei Zustände des *Loops* (*super-up*, *up*, *down*) identifiziert werden (**Abb. 1.5 B**). Auf der anderen Seite hat die so erhöhte Flexibilität in dem Bereich Auswirkungen auf die Substrataffinität des Enzymes. Dies spiegelt sich in einer verminderten Substratbindung von Liganden wider. Nichtsdestotrotz bietet diese Variante gleichzeitig im S<sub>1</sub>-Substratbindungsort, dem Bereich des *Loops* 215 und des *Loops* 226, eine erhöhte Flexibilität, was sie zu einer vielversprechenden Gerüstvariante für die Evolution hin zu D-Aminosäure-spezifischem Trypsin macht (**Abb. 1.5 C**).

## 1.5 Zielstellung

Basierend auf den dargestellten Erkenntnissen stand im Vordergrund dieser Arbeit die Entwicklung, Anwendung und Etablierung eines Screening-Systems zur Identifizierung D-Aminosäure-spezifischer Proteasen. Dabei sollten neue Quellen für D-Aminosäure-spezifische Enzyme aufgedeckt und die molekularen Mechanismen nach Möglichkeit aufgeklärt werden.

Das hierfür zu entwickelnde System sollte so angelegt sein, dass es sowohl zur Detektion nativer Proteasen, als auch idealerweise zur Evolution von L-Aminosäure-spezifischen Proteasen genutzt werden kann. Hierfür war es angedacht, initial das intern gequenchte fluorogene Substrat (IQFS) Abz-D-Arg-D-Ala-pNA mit Hilfe der alkalischen D-Peptidase auf sein Anwendungspotential hin zu untersuchen und in der Folge zur Detektion neuerartiger, nativer D-Arginin-spezifischer oder, wenn dies nicht möglich sein sollte, D-Alanin-spezifischer Proteasen zu nutzen. Nach erfolgreicher Anwendung sollte im Zuge weiterführender Charakterisierungen der erhaltenen Enzyme die Substratbindungsspezifität mittels einer Aminosäuremethylesterbibliothek bzw. einer Pentapeptidbibliothek sowie das synthetische Potential dieser Enzyme ermittelt werden. Zudem war im Falle der erfolgreichen Anwendung des Screening-Substrates angedacht, selbiges zur Entwicklung eines evolutiven Ansatzes mit dem Ziel der Inversion der Stereospezifität von Trypsin hin zu einer D-stereospezifischen Protease zu nutzen. Hierfür sollte zunächst SSAI-Trypsin auf das evolutive Potential hin untersucht und in der Folge die Stereospezifität in einem zu entwickelnden System mittels gelenkter Evolution invertiert werden.

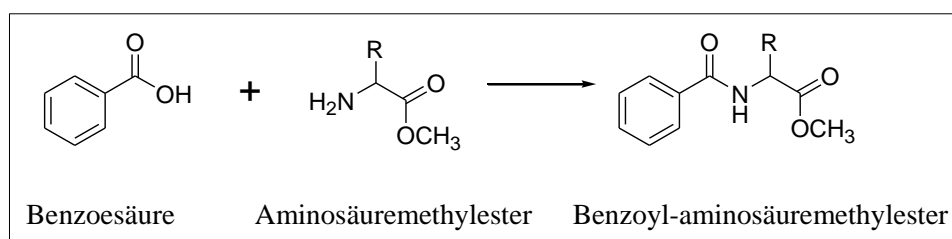
# Methoden

## 2.1 Chemische Synthesen

Die in dieser Arbeit verwendeten Substrate wurden nach Möglichkeit der Substratsammlung der AG Bordusa entnommen. Die Synthese eigener Substrate ist im Folgenden beschrieben. Die Chemikalien hierfür wurden bei Merck, Iris, Novabiochem, Roth und Bachem im bestmöglichen Reinheitsgrad bezogen (**Anhang A5**). Alle Substanzen wurden final mittels präparativer HPLC (Merck/Hitachi-HPLC, Vydac-C18-Säule, variable lin. Gradienten, ACN/H<sub>2</sub>O, 30/60 min,  $\lambda$  254/220 nm) gereinigt und die Produktidentität mittels HPLC (Waters, ACQUITY UPLC, BEH130) und LC-MS (Waters, X-Bridge BEH300) bestätigt. Eine Übersicht über die Reinheit und Ausbeuten der chemischen Synthesen ist dem **Anhang A2** zu entnehmen.

### 2.1.1 Synthese von benzoylierten Aminosäuremethylestern

Zur Synthese der Benzoyl-D,L-aminosäuremethylester (Bz-D/L-Xaa-OMe) wurde Benzoesäure mit dem jeweiligen Aminosäuremethylester mittels der Mischanhydrid-Methode gekuppelt (**Abb. 2.1**) (Chen *et al.*, 1987). Hierfür wurde 1 eq. Benzoesäure und 2 eq. *N*-Methylmorpholin (NMM) unter Rühren entweder in Essigsäureethylester (EE) oder Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Nach Kühlen der Lösung auf -15 °C erfolgte die Zugabe von 1 eq. Chlorameisensäureisobutylester (CAIBE). Nach Inkubation von 15 Minuten bei -15 °C wurde die Kupplung durch Zugabe von 1 eq. Aminosäuremethylester gestartet und anschließend für 60 Minuten bei -15°C und zur Vervollständigung der Reaktion bei Raumtemperatur (RT) über Nacht rühren gelassen. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatografie (DC) verfolgt. Nach Ausschütteln der organischen Phase mittels saurer (5 %-ige KHSO<sub>4</sub>), basischer (NaHCO<sub>3</sub>) und neutraler (gesättigte Kochsalzlösung (NaCl) Extraktion sowie Trocknung über Natriumsulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Im Fall geschützter Aminosäuren (Serin, Glutaminsäure, Tyrosin, Arginin) erfolgte an dieser Stelle die Abspaltung der jeweiligen Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure (TFA) (Lundt *et al.*, 1978; Isidro-Llobet *et al.*, 2009).



**Abb. 2.1 Reaktionsschema zur Synthese von Bz-D/L-Xaa-OMe.** Dargestellt sind die Strukturen der Edukte Benzoesäure und der allgemeinen Aminosäuremethylester (R= Seitenkettenresidue) sowie des korrespondierenden Produktes Benzoyl-D/L-aminosäuremethylester.

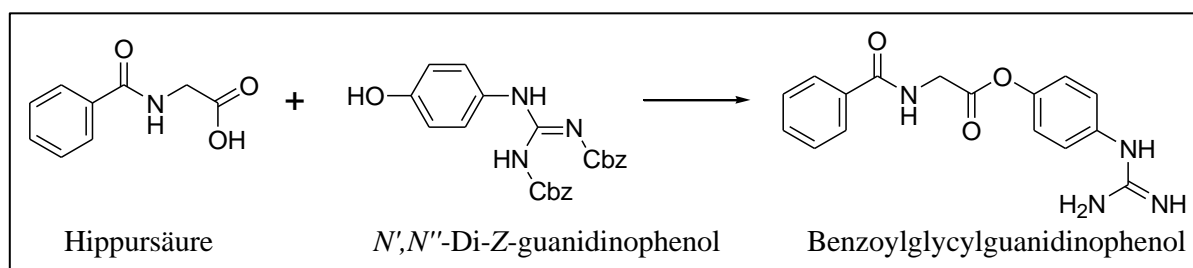


In der Folge wurde der zumeist ölige Rückstand in Wasser/Acetonitril (ACN) gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Gefriertrocknung der Substanz-enthaltenden Fraktionen wurden die Bz-D/L-Xaa-OMe als weiße kristalline Substanzen erhalten. Eine Ausnahme bildeten die Bz-Xaa-OMe von Arginin, Glutamat, Histidin und Serin, welche jeweils als ölige Substanzen erhalten wurden. Produktidentität und Reinheit wurden mittels HPLC und LC-MS bestätigt (**Anhang A3**). Im Fall der Bz-L/D-Xaa-OMe (Xaa: Trp, Phe, Tyr, Val), welche anfällig gegenüber Racemisierungen sind, wurde die enantiomere Reinheit (> 98 %) mittels enzymatischen Verdaus durch entweder Trypsin, Chymotrypsin oder Elastase mit anschließender HPLC-Analyse überprüft.

### 2.1.2 Synthese von Substratmimetika

Die Synthese von Bz-Gly-OGp · TFA erfolgte mittels Aktivesterkupplung (**Abb. 2.2**) (König & Geiger, 1970). Hierfür wurde 1 eq. Hippursäure (Bz-Gly-OH), 0,9 eq. *N', N''*-Dicarboxybenzyl-4-guanidinophenol und 1 eq. 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1',3,3'-tetramethyluronium (TBTU) in Dimethylformamid (DMF) gelöst. Durch Zugabe von 2 eq. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) wurde die Reaktion gestartet, wobei der Verlauf mittels DC verfolgt wurde. Nach 4 Stunden wurde das Lösungsmittel entfernt und der ölige Rückstand in EE gelöst. Anschließend wurde die organische Phase mit 5 %-iger  $\text{KHSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$  und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels wurde der ölige Rückstand in ACN gelöst und die Schutzgruppen durch katalytische Hydrierung entfernt (Sajiki, 1995). Hierfür wurde im Kolben eine Argonatmosphäre erzeugt und katalytische Mengen Palladium in Aktivkohle zugegeben. Nach Einleiten von Wasserstoff und einer Inkubationszeit von 60 Minuten sowie anschließender Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser/ACN gelöst. Die finale Reinigung des Produktes erfolgte durch präparative HPLC. Im Folgenden wurde das Lösungsmittel aus den Produkt-enthaltenden Fraktionen durch Gefriertrocknung entfernt und die Ausbeute zu 40 % bestimmt. Produktidentität und Reinheit wurden mittels HPLC und LC-MS bestätigt.

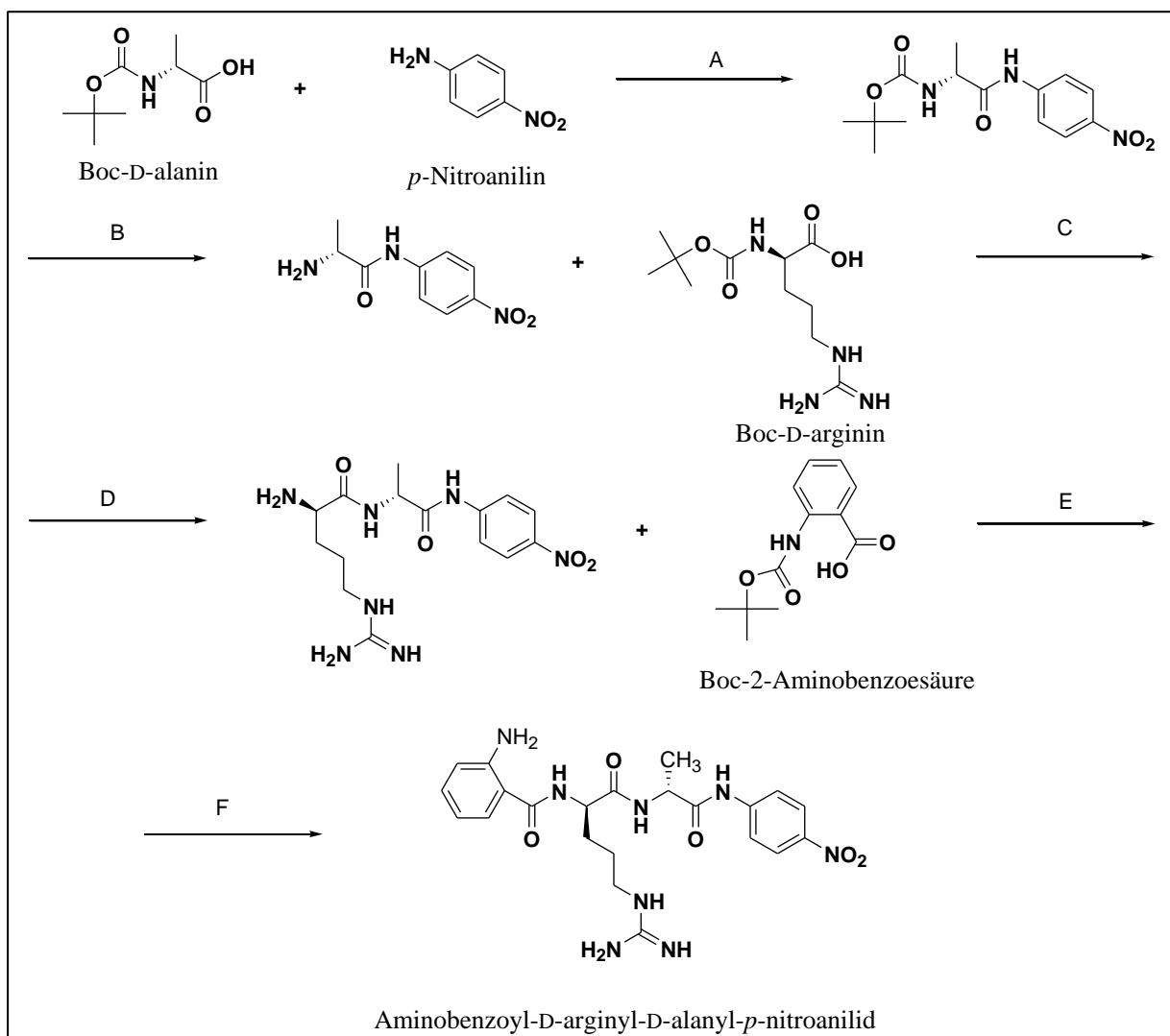
Im Zuge dieser Arbeit wurden weitere Substratmimetika verwendet, welche im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von Fred Armbrust ebenfalls mittels der Aktivestermethode dargestellt wurden (König & Geiger, 1970; Armbrust, 2014).



**Abb. 2.2 Reaktionsschema zur Synthese von Bz-Gly-OGp.** Dargestellt sind die Strukturen der Edukte Hippursäure und *N,N*-Di-Z-guanidinophenol sowie des Produktes Benzoylglycylguanidinophenol.

### 2.1.3 Synthese des intern gequenchten Fluoreszenzsubstrates

Zur Synthese von Abz-D-Arg-D-Ala-pNA wurde im ersten Schritt NH<sub>2</sub>-D-Ala-pNA mittels der gemischten Anhydridmethode (**Abb. 2.3 A**) dargestellt (König & Geiger, 1970). Hierfür wurde 1 eq. Boc-D-Ala-OH und 4 eq. NEM in THF unter Rühren gelöst und auf -15 °C gekühlt. Nach Zugabe von 1,1 eq. CAIBE wurde erneut bei -15 °C für 20 Minuten inkubiert, bevor 1,2 eq. zuvor umkristallisiertes *p*-Nitroanilin zugegeben wurden (Baumann, 1979). Danach erfolgte die Reaktion unter Rühren zunächst für 2 Stunden bei -15 °C und abschließend die Inkubation zur Vervollständigung der Reaktion über Nacht bei RT. Die Produktbildung wurde mittels DC verfolgt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die organische Phase mit 5 %-iger (w/v) KHSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel verdampft.



**Abb. 2.3 Reaktionsschema zur Synthese von Abz-D-Arg-D-Ala-pNA.** Dargestellt sind die Strukturen der Edukte Boc-D-Ala und *p*-Nitroanilin, welche im ersten Schritt (**A**) zu Boc-D-Ala-*p*-NO<sub>2</sub> und nach saurer Abspaltung der Schutzgruppe zu D-Ala-*p*-nitroanilid reagieren (**B**). Im zweiten Schritt der Reaktion wird Boc-D-Arg an das entstandene Produkt mittels PyBOP gekuppelt (**C**) und anschließend erneut die Schutzgruppe abgespalten (**D**). An das so entstandene D-Arg-D-Ala-*p*-nitroanilid wird im letzten Schritt mittels PyBOP Boc-2-Abz-OH gekuppelt (**E**). Nach abschließender saurer Abspaltung (**F**) der Schutzgruppe entsteht als finales Produkt Abz-D-Arg-D-Ala-*p*-NA.

Anschließend erfolgte die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durch Zugabe von 95 % (v/v) TFA (**Abb. 2.3 B**) (Lundt *et al.*, 1978). Nach Verdampfen der TFA wurde der ölige, leicht gelbe Rückstand in ACN/Wasser gelöst und durch präparative HPLC gereinigt. Im Anschluss an die Gefriertrocknung der Produkt-enthaltenden Fraktionen wurde ein leicht gelbes, kristallines Pulver erhalten. Die Ausbeute dieser Reaktion betrug 78 %. Im zweiten Schritt der Reaktion wurde NH<sub>2</sub>-D-Arg-D-Ala-*p*NA mit Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) als Kupplungsreagenz dargestellt (**Abb. 2.3 C**) (Frerot *et al.*, 1991). In einem ersten Schritt wurde zunächst NH<sub>2</sub>-D-Ala-*p*NA in Dichlormethan (DCM) gelöst und auf -5 °C gekühlt. Um Nebenreaktion zu vermeiden, wurde in der Folge der pH der Lösung auf 8,0 eingestellt und 1,2 eq. PyBOP, 1,05 eq. Boc-D-Arg-OH und 2,6 eq. DIPEA zugegeben. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde der Ansatz bei -5 °C für 4 Stunden rühren gelassen und die Reaktion mittels DC verfolgt. Anschließend wurde die organische Phase mit 5 %-iger (w/v) KHSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel verdampft und die *N*-terminale Schutzgruppe mit 95 % (v/v) TFA abgespalten (**Abb. 2.3 D**) (Lundt *et al.*, 1978). Nach Verdampfen der TFA wurde ein öliger, orangener Rückstand erhalten, welcher in ACN/Wasser gelöst wurde. Nach Reinigung durch präparative HPLC betrug die Ausbeute dieser Reaktion 58 %. Im letzten Schritt der Synthese erfolgte die Kupplung von Aminobenzoesäure. Hierfür wurde erneut PyBOP als Kupplungsreagenz verwendet (Frerot *et al.*, 1991). Nach Lösen von 1,05 eq. Boc-2-Abz-OH in DCM wurde die Reaktion analog durchgeführt, verfolgt und aufgearbeitet (**Abb. 2.3 E**). In einem finalen Schritt erfolgte die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durch Zugabe von 95 % (v/v) TFA sowie das Abdampfen selbiger und die Reinigung des finalen Reaktionsproduktes durch präparative HPLC (**Abb. 2.3 F**) (Lundt *et al.*, 1978). Nach Gefriertrocknung der Produkt-enthaltenden Fraktionen wurde ein gräulich-weißes Pulver erhalten. Die Ausbeute der letzten Reaktion betrug 76 % und die Gesamtausbeute 34 %. Produktidentität und Reinheit wurden mittels HPLC und LC-MS bestätigt (**Anhang A2**). Um etwaige Racemisierungen des Produktes auszuschließen, wurde die enantiomere Reinheit (>99 %) mittels enzymatischen Verdaus durch entweder Trypsin oder Elastase überprüft.

#### 2.1.4 Synthese von Acylakzeptoren

Zur Untersuchung der Acyltransferreaktionen wurden in dieser Arbeit diverse Acylakzeptoren verwendet. Eine Gruppe bilden Pentapeptide, welcher der Konsensussequenz H-*all*-L/D-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-OH folgen und entweder an der Position P<sub>1</sub>' , P<sub>2</sub>' oder P<sub>3</sub>' variieren (**Abb. 1.3**). Der Großteil dieser Peptide wurde mittels automatisierter Peptidsynthese unter Nutzung des Syro II Peptide Synthesizers dargestellt (Gross, 1979-1987). Hierfür wurden 125 µmol H-Gly-2Cl-Trt-Harz und NMP als Lösungsmittel verwendet. Die einzelnen Kupplungsreaktionen wurden durchgeführt, indem 4 eq. der jeweiligen Fmoc-aminosäure-OH, 3,6 eq. *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat,

3,6 eq. 1-Hydroxybenzotriazol und 8 eq. DIPEA verwendet wurden. Die Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppen erfolgte durch 25 % Piperidin, während die finale Abspaltung vom Harz durch 95 % (v/v) TFA, 2,5 % (v/v) Wasser und 2,5 % (v/v) Triisopropylsilan (TIS) erfolgte. Nach Abspaltung wurden die Peptide mit Ether gewaschen, in Wasser gelöst und anschließend gefriergetrocknet. Produktidentität und Reinheit wurden mittels HPLC und LC-MS bestätigt (**Anhang A2**). Neben der automatisierten Peptidsynthese wurden einige Substrate durch Spritzensynthese nach selbigem Protokoll dargestellt.

Zusätzlich wurden Aminosäureamide, welche nicht in der Substratsammlung der AG Bordusa vorhanden waren, nach der Methode von SIFFERD UND DU VIGNEAUD im Rahmen der betreuten Diplomarbeit von Claudia Rössler dargestellt und als Nukleophile verwendet (Sifferd & du Vigneaud, 1935; Rössler, 2011).

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Verwendete Organismen

Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Stämme und deren Genotyp.

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), $\lambda^{-}$	Meselson, 1968
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	Wood, 1966
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami 2(DE3) $\rho$ LysS	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 $\Delta$ <i>lacX74</i> $\Delta$ <i>phoA</i> <i>Pvull phoR araD139 ahpC galE galk rpsL</i> (DE3) <i>F'</i> [ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] <i>gor522::Tn10 trxB</i> $\rho$ LysSRARE2 (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Novagen, 2004
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	<i>endA1 gyrA96 thi-1 recA1 relA1 lac glnV44</i> <i>F'</i> [ <i>::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> \Delta(lacZ)M15</i> ] <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> )	Stratagene, 2004
<i>Escherichia coli</i> B $\emptyset$ D	<i>F<sup>-</sup>, \Delta lacU169, araD139, rpsL150, relA1, ptsF rbsR, flbB5301, \Delta tatB</i>	Sargent, 1999
<i>Escherichia coli</i> DADE	<i>F<sup>-</sup>, \Delta lacU169, araD139, rpsL150, relA1, ptsF rbsR, flbB5301, \Delta tatABCD, \Delta tatE</i>	Sargent, 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DLM101 $\alpha$	Mat $\alpha$ , LEU 2-3,-112 HIS 2, 3-11,-15 CAN1, URA3 $\Delta$ , PEP4 $\Delta$ , [cir0], DM 23	Hedstrom, 1992
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	DSMZ: 10
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner 1915	DSMZ: 350
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> Frankland and Frankland 1887	DSMZ: 31

Die Organismen wurden von Novagen, Stratagene, NEB oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die *E. coli* Stämme *Escherichia coli* BØD und *Escherichia coli* DADE sind ein Geschenk von Frank Sargent, Dundee/UK und *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* und *Bacillus cereus* Frankland and Frankland 1887 stammen aus der Stammsammlung der AG Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* DLM101  $\alpha$  wurde freundlicherweise von Professor L. Hedstrom (Brandeis University Waltham, MA, USA) zur Verfügung gestellt.

## 2.2.2 Verwendete Nährmedien

Alle Medien wurden bei 121 °C und 1,2 bar für 20 Minuten autoklaviert. Eine Ausnahme bilden die temperatursensitiven Verbindungen Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin sowie Aminosäurelösungen, Uracil und Leucin. Selbige wurden steril filtriert. Ebenso wurde Glukose gesondert von Medien autoklaviert. Die Herstellung von Agarplatten erfolgte durch Zugabe von 2 % (w/v) Agar-Agar zum jeweiligen Medium. Alle Substanzen wurden in der kommerziell höchsten Reinheit von Fluka und Roth bezogen und wenn nicht anders vermerkt in bidestilliertem Wasser gelöst (**Anhang A5**).

### Medien für die Anzucht von *Escherichia coli* (Green & Sambrook, 2012):

<b>Lysogeny Broth-Medium (LB-Medium)</b>	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 171 mM NaCl
<b>Super Optimal broth with Catabolite repression-Medium (SOC-Medium)</b>	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 20 mM Glukose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 2,5 mM KCl
<b>M9 Screening-Medium</b>	47,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 22,1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,6 mM NaCl, 18,7 mM NH <sub>4</sub> Cl, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,4 % Glukose, 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 6,8, 1 % (v/v) <b>Aminosäurelösung I</b> (je 4 mg/ml Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Val), 1 % (v/v) <b>Aminosäurelösung II</b> (je 4 mg/ml Phe, Trp, Tyr, pH 8,0), 0,1 % (v/v) <b>Spurenelementelösung</b> modifiziert nach Hormann & Andreesen (1989) (0,25 % v/v HCl, 7,5 mM FeCl <sub>2</sub> , 0,5 mM ZnCl <sub>2</sub> , 0,5 mM MnCl <sub>2</sub> , 0,8 mM CoCl <sub>2</sub> , 12 $\mu$ M CuCl <sub>2</sub> , 0,1 mM NiCl <sub>2</sub> , 0,15 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 0,1 mM Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> , 1 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> , 0,1 mM Na <sub>2</sub> VO <sub>3</sub> )
<b>Antibiotika</b>	
<b>Kanamycin (Kan)</b>	30 mg ml <sup>-1</sup> / Endlsg. 50 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>
<b>Chloramphenicol (C)</b>	34 mg ml <sup>-1</sup> (EtOH) / Endlsg. 34 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>
<b>Tetracyclin (Tet)</b>	12,5 mg ml <sup>-1</sup> (EtOH) / Endlsg. 12,5 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>
<b>Ampicillin (Amp)</b>	100 mg/ml (50 % (v/v) EtOH)/ Endlsg. 1 mg ml <sup>-1</sup>

Medium für die Anzucht von Bacilli (Green & Sambrook, 2012)

**Nutrient Broth-Medium (NB-Medium)**      5 g/l Pepton, 3 g/l Fleischextrakt, 85,5 mM NaCl

Medium für die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* (Green & Sambrook, 2012)

**Synthetic Complete-Medium (SC-Medium)**      2,0 % (w/v) Glukose, 6,6 g/l *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids and Ammonium Sulfate*, 1,3 g/l Defizienz-Medium-Mischung (18,75 g Serin, 10 g Threonin, 7,5 g Valin, 5 g Aspartat, 2,5 g Phenylalanin, 1,5 g Tyrosin, 1,5 g Isoleucin, 1,5 g Lysin x HCl, 1 g Histidin x HCl, 1 g Arginin x HCl, 1 g Methionin, 0,37 g Adenin), Selektionsmarker

**Yeast-Pepton-Dextrose-Medium (YPD-Medium)**      10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 1,2 % (w/v) Glukose

**Selektionsmarker**      Leucin-Stammlösung 3,6 g/l / Endlsg. 0,36 mg/l  
                                   Uracil-Stammlösung 2,4 g/l / Endlsg. 0,24 mg/l

**2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen**

Die *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  und Rosetta-gami 2(DE3)pLysS wurden mittels der Kalziumchlorid-Methode chemokompetent gemacht (Hanahan *et al.*, 1991). Hierfür wurden 50 ml LB-Medium 1:100 mit Hilfe einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C unter stetigem Schütteln (180 rpm) inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,4 bis 0,6 wurden die Zellen bei 4 °C und 3.000 xg für 10 Minuten pelletiert, in 25 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung suspendiert und 60 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen wie zuvor beschrieben pelletiert und in 5 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung suspendiert. Nach Zugabe von 750  $\mu$ l Glycerin wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Im Fall von *Escherichia coli* XL1 Blue wurden die Zellen nach der Methode von Inoue kompetent gemacht (Inoue *et al.*, 1990). Hierfür wurden 250 ml SOC-Medium mit Hilfe einer Übernachtskultur 1:100 inokuliert und bei 18 °C und Schütteln (180 rpm) bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2.000 xg und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Das Sediment wurde in der Folge in sterilem Transformationspuffer (TP/ 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 25 mM PIPES, pH 6,7) suspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiter wie oben beschriebener Zentrifugationsschritt und die abschließende Suspendierung der Zellen in 20 ml TP mit 1,5 ml DMSO. Die Zellen wurden zu je 100  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden mit Hilfe des *Frozen Yeast Transformation II*<sup>TM</sup> Kits, welches auf der Lithiumacetat-Methode basiert, kompetent gemacht (Ito *et al.*, 1983). Hierfür wurden 20 ml YPD-Medium mit einer Hefekultur inokuliert und bei 30 °C unter Schütteln (140 rpm) bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,8 bis 1,0 angezogen. Die restliche Aufarbeitung erfolgte nach den Standardprotokollen des Herstellers des oben genannten Kits.

#### 2.2.4 Fraktionierung und Aufschluss von Organismen

Zur Bestimmung und Lokalisierung proteolytischer Aktivität der Organismen gegenüber dem IQFS wurden selbige fraktioniert und die so erhaltenen Fraktionen auf proteolytischen Umsatz hin untersucht.

Zur Fraktionierung von *Escherichia coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS wurden 400 ml M9-Screeningmedium mit Hilfe einer Übernachtskultur inokuliert und unter stetigem Schütteln (150 rpm) bei 37 °C bis zur finalen OD<sub>600 nm</sub> von 1,2 angezogen (Patriarc *et al.*, 1972). Nach Entnahme einer Probe und Aufschluss selbiger mittels Ultraschall (30 % Amplitude, 2 Min / *Gesamtzellkulturfraktion*) wurden die Zellen nachfolgend bei 3.000 xg, 4 °C für 15 Minuten pelletiert. Vom so erhaltenen Überstand wurde eine Probe entnommen (*Überstandfraktion*). Das erhaltene Pellet wurde in 10 ml Suspensionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) homogenisiert und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Nach vorsichtigen Homogenisieren der Zellen in Saccharose-Puffer (40 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris HCl, pH 7,5) und Entnahme einer Probe (*Gesamtzellfraktion*) wurde mittels einer 0,5 M EDTA-Stammlösung (pH 7,5) eine finale Konzentration von 5 mM EDTA in der Suspension eingestellt und Lysozym in einer finalen Konzentration von 0,6 mg/ml zugeben. In der Folge wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und bei 50.000 xg für 20 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe entnommen (*Periplasmafraktion*), der Rest des selbigen verworfen, das Pellet in Suspensionspuffer aufgenommen und mittels Ultraschall (30 % Amplitude, 2 Min., *Sphaeroblastenfraktion*) aufgeschlossen. Die einzelnen Fraktionen wurden in der Folge mit Hilfe des Suspensionspuffers auf 200 µl aufgefüllt und mit 400 µM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA versetzt. Die Proteolyse des Substrates wurde mit Hilfe eines Plattenlesers (NOVOstar (BMG-Labtech) / Fluoreszenzmessung:  $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm, Absorptionmessung: 405 nm) bestimmt.

Zur Fraktionierung der Bacilli-Stämme *Bacillus subtilis* und *Bacillus thuringiensis* wurden jeweils 50 ml NB-Medium mit einer Übernachtskultur inokuliert und für 24 Stunden bei 30 °C unter stetigem Schütteln (160 rpm) angezogen (Roodyn & Mandel, 1960). Nach Entnahme und Aufschluss einer Probe (20 % Amplitude, 5 Min., *Kulturfraktion*) erfolgte das Pelletieren der Zellen bei 4 °C und 4.000 xg für 15 Minuten. In der Folge wurde der Überstand separiert (*Überstandfraktion*) und die Zellen in 5 ml Suspensionspuffer (10 % Saccharose, 1 mg/ml Lysozym, 50 mM Tris HCl, pH 7,4) aufgenommen und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Das Gemisch wurde dann bei 4 °C und 10.000 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand

(*Zellwandfraktion*) wurde separiert und das Pellet in 1 ml kaltem PBS-Puffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (40 % Amplitude, 30 Sek.). Nach Zentrifugation bei 50.000 xg für 30 Minuten bei 4 °C wurden die oberen 30 % des Überstandes entnommen (*Zytoplasmافرaktion*). Der Rest des Überstandes wurde verworfen und das Pellet nachfolgend je zweimal mit PBS gewaschen und pelletiert (400.000 xg, 45 Minuten). Schließlich wurde das Pellet in PBS gelöst und als *Membranfraktion* analysiert. Die Fraktionen wurden in der Folge mit Hilfe des Suspensionspuffers auf 200 µl aufgefüllt und mit 400 µM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA versetzt. Die Freisetzung des Fluorophors wurde mit Hilfe eines Plattenlesers (NOVOstar (BMG-Labtech) / Fluoreszenzmessung: λ<sub>ex</sub> 320 nm, λ<sub>em</sub> 420 nm, Absorptionsmessung: 405 nm) bestimmt.

Neben dem fraktionierenden Aufschluss wurden im Rahmen dieser Arbeit auch weitere Aufschlussmethoden angewendet:

<b>Enzymatische Lyse</b>	20 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris HCl, 1 mg/ml Lysozym pH 7,5, 30 Minuten	Green, 2012
<b>Gefrier-Tau-Aufschluss</b>	flüssiger Stickstoff	Johnson, 1994
<b>Ultraschallaufschluss</b>	Sonotrode (Digital Sonifier W-250 D) oder Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex Super, RK 510H)	Green, 2012 Green, 2012

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme, Ligasen und Polymerasen wurden von Roche, NEB oder Fermentas bezogen (**Anhang A5**). Für die Analytik von DNA-Proben wurde die horizontale Gelelektrophorese verwendet (Green & Sambrook, 2012). Hierfür wurde je nach Applikation 0,8 – 2,0 % (w/v) Agarose (Peqlab) oder 0,8 % (w/v) *low melt*-Agarose (Peqlab) verwendet, welche in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) gelöst wurde. Als Größenstandards kamen der *GeneRuler LowRange DNA Ladder*, *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* und der *Gene Ruler 100 bp DNA Ladder* sowie der *GeneRuler Loading Dye* als Probenpuffer (alle Fermentas) zur Verwendung. Die Anfärbung der Agarosegele erfolgte mit Hilfe des *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen).

### 2.3.1 Verwendete Enzyme und Plasmide

#### verwendete Polymerasen

<i>Taq</i> -Polymerase	analytische PCR	NEB, Fermentas
<i>Pfu</i> -Polymerase	gerichtete Mutagenese Amplifikation von <i>Loop</i> -DNA	NEB
<i>Q5 Hot Start high Fidelity</i> -Polymerase	gerichtete Mutagenese	NEB



Restriktionsenzyme

<i>BbvCI</i>	DNA-Bibliotheken Trypsin	NEB
<i>SacI</i>	DNA-Bibliotheken Trypsin	NEB
<i>AvaI</i>	DNA-Bibliotheken Trypsin	NEB
<i>MfeI</i>	DNA-Bibliotheken Trypsin	NEB
<i>NdeI</i>	Klonierung dHy	NEB
<i>XhoI</i>	Klonierung dHy	NEB
<i>Sall</i>	Klonierung Trypsinvarianten	NEB
<i>BamHI</i>	Klonierung Trypsinvarianten	NEB

weitere Enzyme/Poteine

<i>DpnI</i>	Verdau methylierter DNA	NEB
T4-Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	Roche
BSA	Additiv bei einigen Restriktionsverdauen	Roche, Fermentas

verwendete Plasmide und Oligodesoxyribonukleotide

pET-22b	Klonierung und Biosynthese Trypsinbibliotheken, Amp <sup>R</sup>	Novagen, 2003
pET-30a	Klonierung und Biosynthese dHy, Kan <sup>R</sup>	Novagen, 2003
pST	Gerichtete Mutagenese von Trypsinvarianten, Amp <sup>R</sup>	Hedstrom, 1992
pYT	Biosynthese von Trypsinvarianten, Amp <sup>R</sup>	Hedstrom, 1992
pGP1-2	T7 Polymerase, Amp <sup>R</sup>	Tabor, 1992
pLysS(RARE)	7 seltene Gene, Cm <sup>R</sup>	Novy, 2001

Die pET-Vektoren wurden kommerziell bei Invitrogen erworben, während das Klonierungssystem pST/pYT von L. Hedstrom (Brandeis University Waltham, MA, USA) und der pGP1-2 von der AG Mikrobiologie der Universität Halle zur Verfügung gestellt waren. Das pLysS(RARE)-Plasmid wurde durch Präparation von DNA aus *Escherichia coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS erhalten.

**2.3.2 Isolation von DNA**

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden 5 ml Resistenzmarker-beinhaltendes LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C über 16 Stunden unter Schütteln (140 rpm) inkubiert. Die Isolierung des Plasmids erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, 2011).

Zur Isolation der dHy-Gene wurde die genomische DNA aus den Bacilli-Stämmen *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus cereus* extrahiert (Wilson, 1997). Hierfür wurden 1,5 ml einer in NB-Medium bei 37 °C unter Schütteln (150 rpm) gewachsenen Kultur initial bei 12.000 xg für 2 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in der Folge in 600 µl Aufschlusspuffer (9,5 mM

Tris HCl, 0,95 mM EDTA, 0,5 % (w/v) SDS, 0,1 mg/ml Proteinase K, pH 8,0) gelöst und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl einer 5 M NaCl-Lösung und 80 µl CTAB/NaCl-Lösung (10 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), 0,7 M NaCl) wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,8 mL 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 12.000 xg pelletiert, der wässrige Überstand entnommen, 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben, die Phasen nochmals getrennt und der wässrige Überstand abgenommen. Die DNA wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die pelletierte DNA mit 70 % Ethanol gewaschen und nach jeweils anschließendem Zentrifugieren in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst.

### 2.3.3 Generierung von Genkonstrukten

Während dieser Arbeit wurden verschiedene Genkonstrukte dargestellt, wobei die Synthese der Oligodesoxyribonukleotide, im Folgenden Primer genannt, durch die Firmen MWG Biotech AG und Invitrogen erfolgte. Eine Übersicht über sämtliche verwendeten Primer befindet sich im **Anhang A3**.

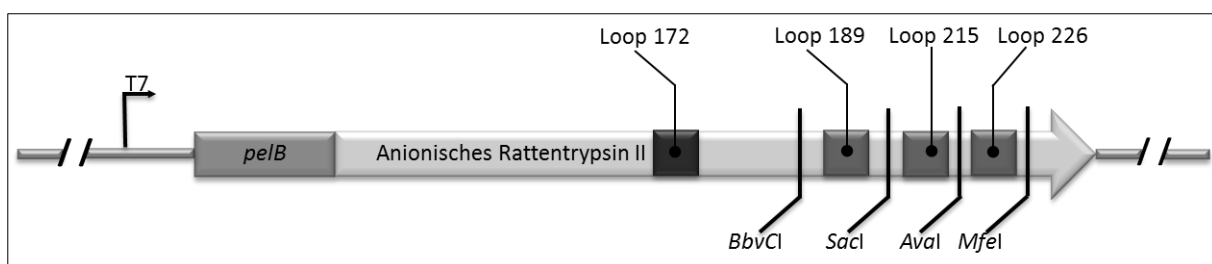
Die Trypsinvarianten wurden mittels verschiedener Strategien dargestellt. So wurde die SSAI-Trypsinvariante mit Hilfe von ortgerichteter Mutagenese in drei PCR-Schritten unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase im pST-Vektor generiert (Braman *et al.*, 1996). Als Matrize diente hierbei der Wildtyp des anionischen Rattentrypsins II (Hedstrom *et al.*, 1992). Das so generierte Konstrukt diente wiederum als Matrize für weitere auf der SSAI-Trypsinvariante basierende Konstrukte, welche mit Hilfe des *Q5 Site-Directed Mutagenesis-Kit* (NEB) generiert wurden (NEB, 2013). Nach erfolgter Mutagenese im pST-Vektor erfolgte der Restriktionsverdau des Konstruktes an den Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I, die Reinigung des Konstruktes in *low melt*-Agarose und schließlich die Klonierung des Fragments in den Biosynthesektor pYT (Hedstrom *et al.*, 1992; Green & Sambrook, 2012).

Die für die dHy-Proteine kodierenden Gene wurden ebenfalls mittels *Pfu*-Polymerase amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986). Die so entstandenen Konstrukte wurden jeweils durch Verdau der Überhänge mit *Nde*I und *Xho*I, Aufreinigung der Fragmente mittels *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) und anschließender Ligation in den pET-30a Vektor kloniert (Roche, 2010b; Green & Sambrook, 2012). Die Subklonierung der dHy-Variante aus *Bacillus thuringiensis* erfolgte freundlicherweise durch D. Treblow.

Zur Kontrolle der korrekten Ligation der Inserts in die Vektoren wurde eine analytische PCR-Reaktion mit Hilfe der *Taq*-Polymerase durchgeführt (Hofmann & Brian, 1991). Dabei wurden die Primer so gewählt, dass jeweils ein Primer im Gen und ein Primer im Vektor bindet. Die Überprüfung der korrekten DNA-Sequenz erfolgt mittels Sequenzierung durch die Firmen LGC Genomics und MWG-Biotech.

### 2.3.4 Darstellung der DNA-Bibliotheken für die Evolution von Trypsin

Zur gelenkten Evolution von anionischem Rattentrypsin II zu einem D-stereospezifischen Trypsin wurde ersteres in einen pET-22b Vektor kloniert, was eine Sekretion von aktivem Trypsin ins Periplasma erlaubt (Vasquez *et al.*, 1989). Zudem wurde der *Loop* 175 mittels gerichteter Mutagenese zu SSAI mutiert (Y172S, P173S, G174A, K175I) und die Schnittstellen zur Randomisierung einzelner Bereiche angepasst (**Abb. 2.4**). Diese Klonierungen geschahen im Vorfeld der hier vorliegenden Arbeit und wurden freundlicherweise von Dr. S. Liebscher durchgeführt. Zur eigentlichen Darstellung der Bibliotheken wurden die jeweiligen Bereiche als Oligodesoxyribonukleotide synthetisiert, wobei einzelne Aminosäuren-Tripletts in den jeweiligen *Loops* als NNK-Nukleotide (N: Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin (T) / K: Guanin, Thymin / MWG-Biotech / **Anhang A3**) ausgetauscht wurden (Reetz & Carballeira, 2007). Für die Amplifikation der einzelnen Bereiche wurden je 10 pmol Primer (vor- und rückwärts), 1 fmol *Loop*-DNA und 0,1 U *Pfu*-Polymerase verwendet. Nach erfolgter PCR-Reaktion (30 Zyklen) wurden die Fragmente im 2 %igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche) nach Herstellerangaben aus selbigem extrahiert (Roche, 2008). In der Folge wurden jeweils 2 µg Fragment-DNA und Vektor-DNA mit jeweils 1 U der jeweiligen Restriktionsenzyme verdaut (**Abb. 2.4**). Nach 12 Stunden Verdau wurden die Ansätze erneut mit Hilfe des *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche) gereinigt, miteinander ligiert und in *Escherichia coli* XL1 Blue transformiert und auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert (Roche, 2008; Green & Sambrook, 2012). Die so erhaltenen Kolonien wurden folgend mittels 0,1 M NaCl-Lösung Wasser von den Agarplatten diluiert und bei 2.500 xg und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Die Extraktion der Vektor-Bibliothek-DNA erfolgte mit Hilfe des *Genopure Plasmid Maxi Prep Kit* (Roche) nach Herstellerangaben (Roche, 2010a). Die Korrektheit der DNA-Sequenz wurde mittels Sequenzierung überprüft.



**Abb. 2.4 Darstellung des SSAI-Trypsin-Genkonstruktes.** Schematisch gezeigt ist der Aufbau des aus *pelB*-Leadersequenz und Gensequenz für anionisches Rattentrypsin bestehenden Konstruktes für die gelenkte Evolution. Zusätzlich ist der Bereich des *Loops* 175, welcher die SSAI-Sequenz trägt (in Schwarz), die zu randomisierenden Regionen *Loop* 189, 215 und 226 (in Grau) sowie die Restriktionschnittstellen *BbvCI*, *SacI*, *Aval* und *MfeI* zur Randomisierung und die T7-Promotorregion verzeichnet.

## 2.4 Methoden zur Reinigung und Nachweis von Proteinen

Zur Analyse von Proteinen wurden verschiedene Methoden genutzt. So wurden zur Identifizierung und Überprüfung der Reinheit der Proteine SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAGE)

verwendet (Laemmli, 1970). Die Anfärbung der Proteine erfolgte dabei entweder durch Coomassie-Blau-Färbung oder durch Silberfärbung (Neuhoff *et al.*, 1985; Nesterenko *et al.*, 1994). Als Größenstandard diente der *PageRuler Prestained Ladder* (Life Technologies/Fermentas). Daneben wurde die Identität der Proteine zusätzlich durch LC-MS-Analytik (Waters micromass ZQ-LC-MS, MassLynx 4.1) überprüft. Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen erfolgte spektrophotometrisch (NanoPhotometer, Implen). Hierfür wurde der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  bei einer Wellenlänge von 280 nm nach GILL und VON HIPPEL berechnet (Gill & von Hippel, 1989). Alle Substanzen wurden in kommerziell höchster Reinheit von Fluka und Roth sowie im Fall der Säulenmaterialien von GE Healthcare und Sigma Aldrich bezogen (**Anhang A5**). Sämtliche Proteinreinigungen fanden bei 8 °C statt.

#### 2.4.1 Native Reinigung der dHy aus *Bacillus thuringiensis*

Durch Fraktionierung des Stammes *Bacillus thuringiensis* (**Kap. 2.2.4**) konnte im Überstand der Kultur Aktivität gegenüber dem IQFS festgestellt werden. Um aufzuklären, welches Protein hierfür verantwortlich ist, wurde eine native Reinigung durchgeführt.

Hierfür wurden in einem ersten Schritt 12 l NB-Medium, welches mit *Bacillus thuringiensis* inokuliert wurde, bis zur späten stationären Phase (etwa 36 Stunden) bei 30 °C unter stetigem Schütteln (130 rpm) inkubiert. Nach Sedimentieren der Zellen bei 4 °C und 4.000 xg für 30 Minuten wurde der Überstand dekantiert, der pH mittels 10 mM NaOH auf 7,8 justiert und anschließend einer Kationenaustauschchromatografie (Toyopearl SP 650M) unterzogen (Sharma *et al.*, 2008). Nach Waschen der Säule mit 20 Säulenvolumen (SV) Standardpuffer (100 mM K-Phosphat, 100 mM NaCl, pH 8,0) erfolgte die Elution des Proteins durch Zugabe von 2 SV Elutionspuffer (80 mM K-Phosphat, 480 mM NaCl, pH 8,0). Die Identifizierung der Protein-haltigen Fraktionen erfolgte mit Hilfe des IQFS. Hierfür wurden die Proben mit 400  $\mu$ M Abz-D-Arg-D-Ala-pNA versetzt und die Aktivität kontinuierlich durch Messung der Fluoreszenz ( $\lambda_{em}$  320 nm,  $\lambda_{ex}$  420 nm) mittels eines Plattenlesers (Novostar, BMG-Labtech) bestimmt. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden in der Folge vereinigt, konzentriert und gegen Standardpuffer dialysiert. Anschließend wurde die Proteinprobe mittels Größenausschlusschromatografie (HiLoad 16/60 Superdex™ 75 *prep grade column*) unter Verwendung des Standardpuffers getrennt (GE-Healthcare, 2001). Die Identifizierung der Aktivität-enthaltenden Fraktionen erfolgte wie oben beschrieben mit Hilfe des IQFS. Nach Vereinigung und Konzentrierung der Fraktionen wurden Größe und Reinheit des Proteins mittels SDS-PAGE (Silberfärbung) ermittelt/überprüft. Gleichzeitig wurde die Mmolekulare Masse des Proteins mittels LC-MS (0 auf 100 % (v/v) ACN, 15 Min, RP C18 column (X-Bridge™ BEH300), Waters micromass ZQ detector,  $\lambda$  220/254 nm) ermittelt. Die Identität wurde mittels N-terminaler Fragmentanalyse freundlicherweise von Dr. A. Schierhorn aufgeklärt (Speicher *et al.*, 2009).

### 2.4.2 Reinigung der dHy

Zur Biosynthese der dHy wurde jeweils 1 l LB-Medium (Kanamycin) 1:100 mit pET-30a-dHy transformierten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen inokuliert und unter Schütteln (130 rpm) bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,6 – 0,8 angezogen. Zur Induktion der Synthese wurden anschließend 0,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zugegeben und die Kultur für weitere 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte die Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 xg und 4 °C für 20 Minuten. Daraufhin wurden die Zellen in Suspensionspuffer gelöst (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 8,0) und mittels Ultraschall (30 % Amplitude, 2 Minuten bei 10 Sekunden Puls und 10 Sekunden Pause) aufgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation bei 125.000 xg und 4 °C für 40 Minuten wurde der Protein-haltige Überstand dekantiert und säulenchromatografisch aufgearbeitet. Hierfür wurde im ersten Schritt eine Kationenaustauschchromatografie (Toyopearl SP 650M) durchgeführt (Sharma *et al.*, 2008). Nach Beladen der Säule und Waschen mit 10 SV Suspensionspuffer wurde das Protein durch Zugabe von 2 SV Elutionspuffer (200 mM Tris/HCl, pH 8,0) eluiert. Nach Identifikation Protein-haltiger Fraktionen durch SDS-PAGE wurden selbige vereinigt und konzentriert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf einer mit Laufpuffer (0,1 M Naphosphat, 0,1 M NaCl, pH 8,0) equilibrierten Größenausschlusschromatografiesäule (HiLoad 16/60 Superdex™ 75 *prep grade column*) aufgetragen und getrennt (GE-Healthcare, 2001). Anschließend wurden die Protein-haltigen Fraktionen mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und konzentriert. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (Silberfärbung) überprüft, die Konzentration mittels UV-Absorption und die molekulare Masse mittels LC-MS ermittelt.

### 2.4.3 Reinigung von Trypsin und -varianten

Für die heterologe Biosynthese der Trypsinvarianten wurde das pYT-Biosynthesystem in *S. cerevisiae* verwendet (Hedstrom *et al.*, 1992). Hierfür wurden zuvor auf den Selektionsmarkern Leucin und Uracil selektierte Zellen zur Inokulation (1:100) von SC-Leu-Medium genutzt. Nach viertägiger Anzucht der Kultur bei 30 °C unter stetigem Schütteln (130 rpm) wurden selbige genutzt, um YPD-Medium 1:100 zu inokulieren. Nach erneuter Inkubation der Kultur für 3 Tage bei 30 °C und Schütteln (130 rpm) wurden die Zellen bei 4.000 xg für 20 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend dekantiert, mit Hilfe von 1 mM HCl auf einen pH von etwa 4,0 eingestellt und säulenchromatografisch aufgearbeitet. Hierfür wurde in einem ersten Schritt eine Kationenaustauschchromatografie (SP 650M) durchgeführt (Sharma *et al.*, 2008). Nach Beladen der Säule mit dem Überstand und Waschen der Säule mit 5 SV Waschpuffer (2 mM Na-Acetat, 100 mM Essigsäure, pH 4,0), erfolgte die Elution des Trypsinogens durch Zugabe von 2 SV Elutionspuffer (1,8 mM Na-Acetat, 90 mM Essigsäure, 200 mM Tris, pH 7,7). Im Folgenden wurden die Protein-haltigen Fraktionen mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, konzentriert und gegen

Aktivierungspuffer (50 mM MES, pH 6,5) dialysiert. Die Aktivierung selbst erfolgte durch Zugabe von 1 % (v/v) Enterokinase-Lösung (200 ng/μl, 20 mM MES, pH 6,5) (Kunitz, 1939). Die Dauer der Aktivierung wurde in Vorversuchen ermittelt und variierte zwischen 2 Stunden (Wildtyp-Trypsin) und 5 Tagen (SSAI-ACMN-Trypsin). Nach Aktivierung von mindestens 80 % der Trypsinogen-Moleküle wurde das Propeptid, Trypsinogen und Trypsin mittels Kationenaustauschchromatografie (HiTrap Q Sepharose FF) getrennt (Nisimoto *et al.*, 1995). Hierfür wurde das Protein auf die equilibrierte Säule aufgetragen, anschließend mit 10 SV Waschpuffer II (50 mM MES, pH 6,6) gewaschen und mit Hilfe eines linearen Gradienten auf 50 % Elutionspuffer II (50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6,6) eluiert. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, gegen Lagerpuffer (50 mM MES, pH 5,0) dialysiert und konzentriert. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (Silberfärbung) überprüft, die Konzentration mittels UV-Absorption bestimmt und die molekulare Masse mittels LC-MS ermittelt.

#### 2.4.4 Untersuchung des Proteintransportes von SSAI-Trypsin

Für die Untersuchung des Proteintransportes von SSAI-Trypsin wurden verschiedene Stämme in LB-Medium (0,8 % (w/v) Glukose) kultiviert. Als Referenz wurden 50 ml LB-Medium mit *Escherichia coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS, welche das Plasmid pET-22b-SSAI-S195A-Trypsin (inaktive Variante) trugen, bei 37 °C und stetigem Schütteln (130 rpm) kultiviert. Bei einer optischen Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,5 wurde die Proteinebiosynthese in diesen Kulturen mit 0,1 mM/1,0 mM IPTG induziert. Als Biosynthesezeit wurden 4 Stunden gewählt. Um den Sec-Sekretionsweg zu inaktivieren, wurde zudem eine Kultur, bei welcher die Biosynthese mit 0,1 mM IPTG induziert wurde, nach einstündiger Biosynthese mit 5 mM Na-Azid versetzt. Die Biosynthesezeit dieser Kultur betrug 6 Stunden. Zur Untersuchung der Biosynthese in Tat-Deletionsvarianten wurden die *E. coli*-Stämme *Escherichia coli* BØD und *Escherichia coli* DADE verwendet. Da dies *E. coli* MC4100-Derivate sind, verfügen sie nicht über die T7-Polymerase und RARE-Codons im Vergleich zu *Escherichia coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS (Sargent *et al.*, 1999). Deshalb wurden in diese Stämme zwei zusätzlich Vektoren (pLysSRARE, pGP1-2) transformiert (Tabor & Richardson, 1992; Novy *et al.*, 2001). Daraus ergaben sich auch Änderungen bei den Anzuchtbedingungen. So wurden die Kulturen in LB-Medium (0,8 % (w/v) Glukose als Additiv) bei 30 °C und stetigem Schütteln (130 rpm) inkubiert. Nach Erreichen der  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,5 wurde die T7-Polymerase-Synthese durch einen 15-minütigen Temperaturanstieg auf 42 °C induziert. Die Biosynthesedauer betrug 10 Stunden. In der Folge wurden nach Probenentnahme die Kulturen bei 12.000 xg und 4 °C für 2 Minuten pelletiert und osmotischen Schock in Periplasma und Pelletfraktion fragmentiert. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau-Färbung.

### 2.4.5 Screening nach D-stereospezifischen Trypsinvarianten

Zur Anzucht der Kulturen wurden 96 *well*-Mikrotiterplatten (MTP) (F-Boden, klar, Corning), *Breathe-Easy-Sealing*-Membranen (Sigma-Aldrich) und ein Platteninkubator (VWR *Incubating Microplate Shaker*/ Standardbedingungen: 750 rpm, 37 °C) genutzt.

Nach Darstellung der Bibliotheken auf DNA-Ebene (**Kap. 2.3.4**) wurden diese in *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS transformiert und je eine Kavität der MTP (150 µl, LB, 0,8 % (w/v) Glukose, Amp, Tet, Cm) mit ca. 20 Klonen inokuliert. Nach Inkubation über Nacht bei Standardbedingungen wurde die MTP genutzt, um eine weiteren MTP mit 150 µl M9-Screeningmedium (Amp, Tet, Cm) mit 5 % (v/v) zu inokulieren. Die erste MTP wurde als Reserve mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 10 % (v/v) je Kavität versetzt und bei –80 °C gelagert. Die Kulturen wurden in der Folge bei Standardbedingungen bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 – 0,7 angezogen und anschließend mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Biosynthesedauer betrug 4 – 6 Stunden. In der Folge wurden die OD<sub>600 nm</sub> der jeweiligen Kavitäten bestimmt, die Zellen mittels Ultraschallbad aufgeschlossen (eisgekühlt, 5 Minuten) und für 15 Minuten bei 2.000 xg und 4 °C sedimentiert. Vom Überstand wurden 100 µl in eine neue MTP übertragen, mit je 100 µl Messpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,8) versetzt und 400 µM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die Platten wurden für ca. 60 bis 84 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Umsatz wurde anschließend mit Hilfe eines Plattenlesers (NOVOstar, BMGLabtech, Fluoreszenzmessung: λ<sub>ex</sub> 320 nm, λ<sub>em</sub> 420 nm, Absorptionsmessung: 405 nm) bestimmt. Kavitäten mit erhöhter hydrolytischer Aktivität wurden nach Verdünnung ur Inokulation einer neuen MTP nach obigem Verlauf genutzt. Nach Abschluss dieser zweiten Screening-Runde wurden jene Kavitäten mit der höchsten Aktivität genutzt, um 5 ml LB/Glc-Medium (0,8 % (w/v) Glukose, Amp, Tet, C) zu inokulieren. Die Kulturen wurden anschließend bei 12.000 xg und 4 °C für 5 Minuten sedimentiert und die DNA mittels Chloroform/Phenol-Extraktion extrahiert (Green & Sambrook, 2012). Die so gewonnene DNA wurde in der Folge in *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS transformiert und erhaltene Einzelkolonien zur erneuten Inokulation einer MTP genutzt. Das Aktivitäts-Screening erfolgte nach obigem Verlauf. Von den Kavitäten mit der höchsten Aktivität wurde abschließend die Sequenz des Plasmids mittels Sequenzierung bestimmt.

## 2.5 Charakterisierung von Enzymen

### 2.5.1 Kristallisation der DHy aus *Bacillus thuringiensis*

Zur Kristallisation der D-stereospezifischen Hydrolase wurde selbige auf 120 µM in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 0,1 M NaCl, pH 8,0 konzentriert. Anschließend wurde die Proteinlösung 1:1 mit der Präzipitantenlösung (0,1 M Imidazol, 0,1 M MES, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM CaCl<sub>2</sub>, 12,5 % (v/v) 2-Methyl-1,3-propandiol, 12,5 % (w/v) Polyethylenglykol (PEG) 1000, 12,5 % (w/v) PEG

3350 / Morpheus, Molecular Dimensions) versetzt und die Kristallisation mittels *hanging drop*-Dampfdiffusion durchgeführt (McPherson, 2004). Eine Kristallbildung war nach 14 bis 21 Tagen zu beobachten. Die Röntgenmessung und Datensammlung wurde bei  $-172\text{ °C}$  am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung (BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin) an der Messeinrichtung BL 14.1 bzw. BL 14.2 durchgeführt. Da eine Ko-Kristallisation mit Substraten nicht möglich war, wurden *soaking*-Experimente für 30 Minuten in der Präzipitantenlösung mit 0,5 M Benzoyl-D-arginylmethylester (Bz-D-Arg-OMe) durchgeführt (McPherson, 2004). Die Indizierung und Integration wurde mit dem Programm XDS und die Skalierung mit den Programmen XSCALE und SCALA aus der CCP4-Suite durchgeführt (Collaborative-Computational-Project, 1994; Kabsch, 2010; Winn *et al.*, 2011). Die Ligandenfreie Struktur wurde durch *molecular replacement* unter Verwendung der PDB-Koordinaten-Datei 1PWD und mit Hilfe des Programms MrBUMP ermittelt (Silvaggi *et al.*, 2005; Drenth, 2007; Keegan & Winn, 2007). Die Aufklärung der Struktur des *soakings* von Bz-D-Arg-OMe wurde ebenfalls durch *molecular replacement* gelöst. Dabei wurde die Ligandenfreie Struktur als Ausgangsmodell und das Programm PHASER benutzt (McCoy *et al.*, 2007). Die Optimierung beider Strukturen erfolgte in iterativen Runden, wobei die Rotations- und Translationsfunktionen der nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS) mittels PHENIX bzw. manuell mittels COOT angewendet wurden (Emsley *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2011). Die Geometrien wurden mittels MolProbity vermessen (Chen *et al.*, 2010). Die Durchführung und Auswertung der Kristallisation wurde in Kooperation mit Dr. Michael Schöpfel (Physikalische Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg) durchgeführt.

### 2.5.2 Enzymkinetische Charakterisierungen

Alle Messungen wurden sowohl als technische als auch als biologische Replikate bestimmt. Als Messpuffer kamen Trypsin-Messpuffer A (0,1 M HEPES, 10 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,8), Trypsin-Messpuffer B (0,1 M HEPES, 10 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8,0) und DD-Peptidase-Messpuffer (0,1 M Na-Phosphat, pH 8,0) zum Einsatz.

Die Analysen erfolgten entweder mittels UPLC (Waters UPLC, BEH300 C18, Flussrate:  $0,5\text{ ml min}^{-1}$ , Laufmittel ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 % (w/v) TFA) oder HPLC (Waters Breeze, LiChrospher 100 RP-18, Flussrate:  $1,0\text{ ml min}^{-1}$ , Laufmittel ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 % (w/v) TFA). Edukte und Produkte wurden mittels LC-MS verifiziert (Waters micromass ZQ-LC-MS, MassLynx 4.1, X Bridge C8, Flussrate:  $0,3\text{ ml min}^{-1}$ ,  $\lambda$  220/254 nm, variable Gradienten, Laufzeit: 20 min, Laufmittel ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 % Ameisensäure). Daneben wurden die Kinetiken im Fall von Bz-L-Arg-pNA mittels Plattenleser (NOVOstar, BMGLabtech,  $\lambda$  405 nm,  $30\text{ °C}$ ) und im Fall von Bz-L-Arg-AMC mittels Fluoreszenzspektrophotometer (Luminescence Spectrometer LS50B  $\lambda_{\text{ex}}$  381 nm (Spalt: 5 nm),  $\lambda_{\text{em}}$  455 nm (Spalt: 10 nm)) bestimmt.



### Titration von Trypsin zur Bestimmung des Anteils aktiver Trypsinspezies

Zur Bestimmung der Aktivitäten von Trypsin wurde initial der Anteil aktiver Trypsinspezies, wenn möglich mit Hilfe des Inhibitors 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF) titriert (Lawson *et al.*, 1982). Sämtliche Messungen wurden bei 30 °C mit 25 und 50 µM Trypsin (Konzentration photometrisch bestimmt, **Kap. 2.4.3**) und mit 2 µM bis 200 µM AEBSF durchgeführt. Zum Ausschluss von Substrataffinität-bedingten Effekten wurde die Aktivität gegen Ac-L-Arg-pNA bei 3 verschiedenen Konzentrationen (20 µM, 100 µM, 250 µM) bestimmt. Um eine möglichst vollständige Inhibition zu gewährleisten, wurden die Proben vor der Aktivitätsbestimmung 15 Minuten mit dem Inhibitor in Trypsin-Messpuffer A inkubiert. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Plattenlesers (NOVOstar, BMGLabtech) bei einer Wellenlänge von 405 nm durchgeführt.

### Bestimmung der S<sub>1</sub>-Substratbindungsortspezifität

Zur Bestimmung der Aktivitätsprofile der einzelnen Enzyme wurde eine Bz-D/L-Xaa-OMe-Bibliothek synthetisiert (**Kap. 2.1.1**). Die Auswahl der Aminosäuren folgte dabei dem Kriterium, dass möglichst jede chemische Eigenschaft der Seitenketten in dieser Bibliothek mindestens einmal vertreten ist. Alle Aminosäuren wurden zu 200 mM in DMF gelöst, so dass entsprechend jeder Ansatz 1 % (v/v) DMF enthielt. Eine Ausnahme bildete das schwer lösliche Tryptophan, hier wurden 5 % (v/v) DMF verwendet. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte mittels UPLC (variable Gradienten, Laufzeit: 3 Min, λ 254 nm). Die Messungen erfolgten bei 30 °C unter Schütteln (750 rpm) in entweder Trypsin-Messpuffer A (Trypsinvarianten) oder in DD-Peptidase-Messpuffer (ADP, DHy). Zudem wurde ein Aktivitätsprofil von SSAI-Trypsin mit Bz-L-Xaa-OGp-Estern bestimmt. Die Auswahl der Aminosäuren in dieser Bibliothek folgte den oben aufgeführten Gesichtspunkten. Die Messbedingungen waren die gleichen wie bei der Bz-D/L-Xaa-OMe-Bibliothek, lediglich Trypsin-Messpuffer B wurde verwendet. Die Enzymmenge und der Messzeitraum wurden entsprechend den Aktivitäten angepasst.

Zur Bestimmung der Aktivität wurde der Anteil des Hydrolyseproduktes (ermittelt durch Integration der Signale in den UPLC-Chromatogrammen) gegen den Zeitwert der Injektion aufgetragen und der Geradenanstieg, entsprechend der Volumenaktivität, mittels linearer Regression bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte ist die spezifische Aktivität angegeben, welcher der Volumenaktivität bezogen auf die Enzymmenge entspricht (**Gl. 2.1**) (Schellenberger, 1989).

$$A_S = A_V/[E]$$

**Gl. 2.1 Berechnung der spezifischen Aktivität A<sub>S</sub>.** A<sub>V</sub> Volumenaktivität, [E] Enzymkonzentration

Neben der Bestimmung des Aktivitätsprofils erfolgte zudem die Bestimmung der Aktivität in Korrelation zum pH-Wert. Hierfür wurde jeweils die spezifische Aktivität für einen Bz-D/L-Xaa-OMe bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Im Fall der dHy wurden 0,1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 8,0/6,0 – 8,0), 0,1 M Bis-Tris-Propan (pH 8,0 – 9,0), 0,1 M Tris/HCl (pH 9,0 – 10,0) und im Fall von Trypsin 0,1 M MES (pH 6,0 – 7,0), 0,1 M HEPES (pH 6,5 – 8,5), 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5 – 9,0) mit jeweils 100 mM NaCl und 10 mM CaCl<sub>2</sub> verwendet. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte bei 30 °C unter Schütteln (750 rpm) mittels UPLC (variable Gradienten, Laufzeit: 3 Min, λ 254 nm).

#### Bestimmung der kinetischen Parameter

Neben der Ermittlung von Aktivitätsprofilen wurden für einige Substrate zudem die kinetischen Parameter der Katalysekonstante  $k_{cat}$ , der Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  und der sich daraus ableitenden katalytischen Effizienz  $k_{cat}/K_M$  bestimmt. Diese Werte wurden aus dem hyperbolen Verlauf der  $v$ -[S]-Charakteristik mittels der Michaelis-Menten-Gleichung abgeleitet (**Gl. 2.2**) (Michaelis & Menten, 1913).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M}$$

**Gl. 2.2 Michaelis-Menten-Gleichung.**  $v$  Reaktionsgeschwindigkeit,  $V_{max}$  Maximalgeschwindigkeit,  $K_M$  Michaelis-Konstante, [S] Substratkonzentration

Zur Lösung dieser Gleichung wurden in dieser Arbeit verschiedene Wege gewählt. So wurden die Parameter entweder durch direkte Regression, Linearisierung oder Integration ermittelt (Hanes, 1932; Lineweaver & Burk, 1934; Eadie, 1942; Hofstee, 1959; Goudar *et al.*, 1999). Die Bestimmung der Parameter erfolgte für Bz-D/L-Xaa-OMe mittels UPLC (variable Gradienten, Laufzeit: 3 Min, λ 254 nm), für das Substrat Bz-L-Arg-pNA mittels Plattenleser und für das Substrat Bz-L-Arg-AMC mittels Fluoreszenzspektrometer. Die Messungen erfolgten bei 30 °C unter Schütteln (750 rpm) entweder in Trypsin-Messpuffer A (Trypsinvarianten) oder in DD-Peptidase-Messpuffer (ADP, dHy). Die Enzymmenge und der Messzeitraum wurden entsprechend den Aktivitäten angepasst.

#### Bestimmung der S'-Bindungsortspezifitäten

Zur Bestimmung der Spezifitäten im Substratbindungsbereich S' wurden Modellacyltransferreaktionen durchgeführt (Schellenberger *et al.*, 1994). Dabei wurden als Acyl-donoren Aminosäuremethylester (Bz-D/L-Xaa-OMe) und Guanidinophenol-Substratmimetika (Bz-Xaa-OGp) eingesetzt. Als Nukleophile wurden entweder Aminosäureamide (D/L-Xaa-NH<sub>2</sub>) oder Peptide verwendet. Die Modellreaktionen wurden so eingestellt, dass maximal 20 % des Acyl-donors in 2 Minuten enzymatisch hydrolysiert wurde. Die Quantifizierung erfolgte durch Berechnung des Partitionswertes (Schellenberger *et al.*, 1994). Dieser Parameter beschreibt

das Gleichgewicht der Hydrolyse- zur Aminolysegeschwindigkeit in Relation zur eingesetzten effektiven Nukleophilkonzentration (**Gl. 2.3**).

$$p = \frac{v_H \cdot [N_{eff}]}{v_A}$$

**Gl. 2.3 Berechnung der Partitionswert  $p$**   $v_H$  Geschwindigkeit Hydrolyse,  $v_A$  Geschwindigkeit Aminolyse,  $[N_{eff}]$  effektive Nukleophilkonzentration

Die effektive Nukleophilkonzentration  $[N_{eff}]$  beschreibt die Konzentration der effektiv für den Acyltransfer zur Verfügung stehenden deprotonierten Acylakzeptor-Moleküle, welche wiederum abhängig vom pH-Wert der Reaktion und vom  $pK_s$ -Wert des Nukleophils ist (Schellenberger *et al.*, 1991). Entsprechend kann sie nach HENDERSON-HASSELBALCH berechnet werden (Hasselbalch, 1917). Die Messungen erfolgten bei 30 °C unter Schütteln (750 rpm) entweder in Trypsin-Messpuffer B (Trypsinvarianten) oder in DD-Peptidase-Messpuffer (ADP, DHy). Im Fall von D/L-Xaa-NH<sub>2</sub> als Nukleophil wurden 20 mM D/L-Xaa-NH<sub>2</sub> und 2 mM Acyldonor eingesetzt. Im Fall der Peptide wurden 1 mM Peptid und 10 mM Acyldonor eingesetzt. Alle Peptide wurden vorher in 14 % (v/v) DMSO gelöst, so dass der finale Messansatz 7 % (v/v) DMSO enthielt. Die Bestimmung der Partitionswerte erfolgte mittels HPLC (variable Gradienten, Laufzeit: 20 Min,  $\lambda$  254 nm).

## 2.6 Verwendete Programme

Die Software zur Steuerung genutzter Geräte sowie zur Datenauswertung ist dem Geräteverzeichnis (**Anhang 1**) zu entnehmen. Alle chemischen Strukturen und Reaktionsmechanismen wurden mittels ChemDraw Ultra 7.0 (PerkinElmer) erstellt. Die mathematische Auswertung erfolgte mittels Origin 8.0 (OriginLab Corporation) bzw. SigmaPlot 12.0 (Systat Software). Plasmide und DNA wurden mit SerialCloner 2.6 verwaltet. Abgebildete Gelelektropherogramme wurden eingescannt und zur besseren Anschaulichkeit in ein Graustufenbild konvertiert (Office 2010 (Microsoft)/ PhotoshopElements 7.0 (Adobe)). Die Darstellung von Proteinstrukturen erfolgte mittels PyMOL v1.1 (Schrödinger).

### Bioinformatische Programme

<b>NEBcutter V3.0</b>	DNA-Schnittstellendesign	Vincze, 2003
<b>Oligo Calc</b>	Optimierung von Oligonukleotiden	Kibbe, 2007
<b>ProtParam</b>	Bestimmung von Proteineigenschaften	Gasteiger, 2005
<b>eggNOG3.0</b>	funktionelle Annotation	Powell, 2012
<b>BLAST</b>	Alignment von Sequenzen	Altschul, 1990
<b>MultAlin</b>	Alignment von Strukturen	Corpet, 1988
<b>ESPrpt3</b>	Darstellung von Alignments	Robert, 2014
<b>HotSpotwizard</b>	evolutive Strukturanalyse	Pavelka, 2009
<b>ConSurfHSSP</b>	Bestimmung Konservierungsgrad	Glaser, 2005

# Ergebnisse

## 3.1 Untersuchung nativer D-stereospezifischer Proteasen

Die alkalische D-Peptidase (ADP) wurde in vorangegangenen Studien als D-Phenylalanin-spezifische Endopeptidase mit einem pH-Optimum von 8 bis 10 charakterisiert (Asano *et al.*, 1996). Diese Eigenschaft sowie die hohe Akzeptanz gegenüber Substratmimetika des Guanidinophenol-Typs führten in der Folge zum Einsatz des Enzyms in der Semisynthese von nativen *all*-L-Proteinen, wobei die gebildeten Produkte proteolytisch stabil gegenüber einer Sekundärhydrolyse durch die ADP sind (Wehofsky *et al.*, 2008). Für eine breite Anwendung der ADP innerhalb dieses Konzeptes und um etwaige Rückschlüsse über den Aufbau des aktiven Zentrums D-stereospezifischer Proteasen zu erhalten, wurde daher die ADP initial hinsichtlich den  $S_1$ - und  $S_{1-3'}$ -Substratbindungsstellen charakterisiert. Im Folgenden sollte die Akzeptanz der ADP gegenüber dem IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-pNA mit dem Ziel der Verifikation und Etablierung eines *Screening*-Systems zur Detektion nativer D-Aminosäure-spezifischer Peptidaseaktivität und daraus resultierenden potentiellen neuartigen Biokatalysatoren untersucht werden.

### 3.1.1 Charakterisierung der Substratspezifität der alkalischen D-Peptidase

Die Analyse der  $S_1$ -Substratbindungsstellen-spezifität erfolgte mit Hilfe einer Bz-D/L-Xaa-OMe-Bibliothek. Die Auswahl der Aminosäuren orientierte sich an ihren chemischen Eigenschaften. So wurden die benzylierte Methylester der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die polaren Aminosäuren Arginin, Serin, Glutaminsäure, Asparagin und Histidin, die hydrophob-aliphatischen Aminosäuren Alanin und Valin und das schwefelhaltige, unpolare Methionin in jeweils beiden Stereokonformationen synthetisiert. Ergänzt wurde das Spektrum durch das achirale Glycin und die Iminosäure Prolin.

Durch die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Hydrolyse dieser Substrate konnten zwei Grundannahmen bestätigt werden. Zum Ersten präferierte die ADP D-Aminosäure-haltige Estersubstrate, die L-Aminosäure-Stereoisomere wurden 4.000- (Phe) bis 10.000-fach (Met) langsamer umgesetzt, als die entsprechenden D-Stereoisomere (**Tab. 3.1**). Zum Zweiten wurde die  $S_1$ -Substratbindungsstellen-spezifität der ADP gegenüber D-Phenylalanin betätigt. So konnte für das Substrat Bz-D-Phe-OMe mit  $127,8 \text{ kat mol}^{-1}$  die höchste spezifische Aktivität  $A_S$  ermittelt werden. Folgend wurden die katalytischen Parameter für das Substrat Bz-D-Phe-OMe bestimmt. Es weist einen  $K_M$ -Wert von  $57 \mu\text{M}$  und einen  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $139,1 \text{ s}^{-1}$  auf. Hieraus ergibt sich hohe Spezifitätskonstante  $k_{\text{cat}}/K_M$  von  $685.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (**Anhang A4**). Die Analyse der hydrolytischen Aktivität weiterer Bz-D/L-Xaa-OMe-Substrate zeigte eine Aktivität nahezu aller D-Aminosäure-haltigen Substrate durch die ADP auf. Dabei wurden die Substrate Bz-D-Met-OMe ( $52,4 \text{ kat mol}^{-1}$ ), Bz-D-Tyr-OMe ( $24,0 \text{ kat mol}^{-1}$ ) und Bz-

D-His-OMe ( $9,0 \text{ kat mol}^{-1}$ ) verhältnismäßig schnell umgesetzt, während die weiteren untersuchten Bz-D-Xaa-OMe Substrate niedrigere bzw. im Fall der Iminosäure D-Pro keine Umsatzraten aufwiesen (**Tab. 3.1**).

**Tab. 3.1 Bestimmung der spezifischen Hydrolyseaktivitäten von Bz-D/L-Xaa-OMe durch ADP.**

Amino- säure (Xaa)	spezifische Aktivität $A_s$ (mkat $\text{mol}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	
	Bz-D-Xaa-OMe	Bz-L-Xaa-OMe
Phe	127.800,0	32,1
Tyr	24.000,0	6,1
His	9.000,0	6,2
Trp <sup>b</sup>	3.800,0	n. d. <sup>c</sup>
Met	52.400,0	5,9
Val	4.100,0	n. d.
Ala	4.000,0	n. d.
Ser	1.250,0	n. d.
Arg	21,9	5,3
Glu	18,2	n. d.
Pro	n. d.	n. d.
Gly	82,8	

<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: 100 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 2 mM Bz-D/L-Xaa-OMe, 0,01 – 1  $\mu\text{M}$  ADP / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC (variable Gradienten, 3 min,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug < 5 %. / <sup>b</sup> 5 % (v/v) DMF wurden verwendet / <sup>c</sup> n. d. - Ein Umsatz konnte nicht detektiert werden.

Die  $S'$ -Substratbindungs-spezifität wurde mit Hilfe von reziproken Partitions-werten ( $p^{-1}$ ) durch Modellacyltransferreaktionen mit Aminosäureamiden und Pentapeptiden, welche als Acylakzeptoren fungieren, bestimmt (Schellenberger *et al.*, 1991). Die Auswahl selbiger erfolgte dabei nach den gleichen Kriterien, wie für Studien zur  $S_1$ -Substratbindungs-spezifität. Als Acyldonoren kamen Bz-D-Phe-OMe und der Guanidinophenyl-Ester Bz-Gly-OGp zum Einsatz. Im Vergleich zum Substrat Bz-D-Phe-OMe wies Bz-Gly-OGp eine deutlich verringerte Spezifitätskonstante  $k_{\text{cat}}/K_M$  von  $1880 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  auf. Diese scheinbare Verringerung der Akzeptanz des Substrates basierte dabei sowohl auf dem erhöhten  $K_M$ -Wert (1,83 mM) als auch dem verringerten  $k_{\text{cat}}$ -Wert ( $3,43 \text{ s}^{-1}$ ) begründet (**Anhang A4**).

Im Gegensatz zum  $S_1$ -Substratbindungsort wies die Untersuchung der  $S_1'$ -Substratbindungs-spezifität mit Hilfe der Aminosäureamide keine direkte Tendenz für eine Stereospezifität durch die ADP auf. Vielmehr schien die Spezifität gegenüber Acylakzeptoren deren Volumen der Seitenkette zu folgen (**Tab.3.2**). So wiesen L/D-Phe-NH<sub>2</sub> (L-Phe-NH<sub>2</sub>:  $2440 \text{ M}^{-1}$  / D-Phe-NH<sub>2</sub>:  $699 \text{ M}^{-1}$ ) und L/D-Met-NH<sub>2</sub> (L-Met-NH<sub>2</sub>:  $206 \text{ M}^{-1}$  / D-Met-NH<sub>2</sub>:  $98 \text{ M}^{-1}$ ) im Fall von Bz-D-Phe-OMe als Acyldonor die höchsten  $p^{-1}$  auf.

Tab. 3.2 Bestimmung der S<sub>1</sub>'- bis S<sub>3</sub>'-Substratbindungsortspezifitäten der ADP.<sup>1</sup>

	reziproker Partitionswert p <sup>-1</sup> (M <sup>-1</sup> ) <i>all</i> -L-Acylakzeptorsequenz <sup>a,b</sup> :				Amino- säure (Xaa)	reziproker Partitionswert p <sup>-1</sup> (M <sup>-1</sup> ) <i>all</i> -D-Acylakzeptorsequenz:			
	Xaa- NH <sub>2</sub>	Xaa- AAAG	A-Xaa- AAG	AA- Xaa-AG		Xaa- NH <sub>2</sub>	Xaa- AAAG	A-Xaa- AAG	AA-Xaa- AG
	<b>Bz-D-Phe-OMe</b>	n. d. <sup>c</sup>		51,5			<b>Ala</b>	n. d.	
n. d.		8,3	35,0	31,8	<b>Glu</b>	n. d.	28,3	n. d.	n. d.
2439,0		435,0	23,4	40,5	<b>Phe</b>	699,0	74,1	n. d.	n. d.
22,5		10,6	17,9	9,6	<b>Gly</b>	22,5	158,0	18,9	15,6
150		36,9	12,9	35,6	<b>Leu</b>	63,3	41,3	22,6	n. d.
207		85,5	19,6	37,2	<b>Met</b>	98,2	84,7	68,0	n. d.
n. d.		15,3	n. d.	n. d.	<b>Asn</b>	103,0	24,2	n. d.	8,05
14,7		69,4	n. d.	n. d.	<b>Pro</b>	n. d.	94,3	n. d.	n. d.
82,7		146,0	52,4	84,7	<b>Arg</b>	219,0	49,3	44,1	37,5
n. d.		17,4	n. d.	21,3	<b>Ser</b>	n. d.	23,0	77,5	25,0
<b>Bz-Gly-OGp</b>	24,0			12,8	<b>Ala</b>	28,1			2,7
	9,60	14,9	8,0	n. d.	<b>Glu</b>	6,2	3,7	4,4	n. d.
	5882,0	769,0	172,0	n. d.	<b>Phe</b>	3125,0	17,6	68,5	n. d.
	41,3	n. d.	20,2	n. d.	<b>Gly</b>	41,3	26,8	7,8	n. d.
	1562,0	72,3	59,9	7,6	<b>Leu</b>	584,8	12,9	11,1	6,902
	629,0	35,5	11,3	94,3	<b>Met</b>	205,0	43,1	19,5	14,9
	25,0	10,7	n. d.	n. d.	<b>Asn</b>	26,8	6,9	n. d.	10,7
	19,8	34,1	n. d.	n. d.	<b>Pro</b>	24,2	52,1	n. d.	n. d.
	217,0	47,0	91,7	85,5	<b>Arg</b>	168,0	6,4	46,7	135
	15,7	28,6	10,7	n. d.	<b>Ser</b>	8,6	10,1	21,9	n. d.

<sup>a</sup> Die Konsensussequenz der Peptide ist Ala-Ala-Ala-Ala-Gly, wobei jeweils *all*-L- oder *all*-D-Peptide, variierend in Position P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> oder P<sub>3</sub>, verwendet wurden. /<sup>b</sup> Reaktionsbedingungen: 100 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 7 % (v/v) DMSO (im Fall von Peptiden), 1 – 2 mM Bz-D-Phe-OMe/Bz-Gly-OGp, 10 – 20 mM Peptide/Xaa-NH<sub>2</sub>, 0,01 – 1 μM ADP. / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC/HPLC (variable Gradienten, 3/15 min, λ 254 nm). Die Messabweichung betrug < 10 %. /<sup>c</sup> n. d. – Ein Umsatz konnte nicht detektiert werden.

Wurde hingegen das Substratmimetikum Bz-Gly-OGp verwendet, so waren die p<sup>-1</sup>-Werte und damit die S<sub>1</sub>'-Substratbindungsortspezifitäten gegenüber nahezu allen untersuchten Amino-säureamiden erhöht. Hierbei wies erneut L/D-Phe-NH<sub>2</sub> (L-Phe-NH<sub>2</sub>: 5882 M<sup>-1</sup> / D-Phe-NH<sub>2</sub>: 3125 M<sup>-1</sup>) die höchsten p<sup>-1</sup>-Werte auf. Der zweitbeste p<sup>-1</sup>-Wert wurde im Gegensatz zu Bz-D-Phe-OMe jedoch mit L/D-Leu-NH<sub>2</sub> (L-Leu-NH<sub>2</sub>: 1562 M<sup>-1</sup> / D-Leu-NH<sub>2</sub>: 584 M<sup>-1</sup>) beobachtet. Um die Akzeptanz des Enzyms gegenüber längeren Nukleophilen zu untersuchen, wurden folgend Pentapeptide als Acylakzeptoren verwendet. Diese Peptide

<sup>1</sup> Teile der Ergebnisse der hier dargestellten Daten wurden im Rahmen der betreuten Diplomarbeit von Claudia Rößler generiert.

folgen der allgemeinen Konsensussequenz Ala<sup>1'</sup>-Ala<sup>2'</sup>-Ala<sup>3'</sup>-Ala-Gly, wobei jeweils entweder P<sub>1'</sub>, P<sub>2'</sub> oder P<sub>3'</sub> variiert wurden.

Die Analyse des Acyltransfers mit Bz-D-Phe-OMe als Acyldonor und an P<sub>1'</sub>-Position variierten Pentapeptiden wies im Vergleich mit den analogen Aminosäureamiden deutlich verminderte p<sup>-1</sup>-Werte auf (**Tab. 3.2**). Besonders deutlich wurde dies im Fall von L/D-Phe in P<sub>1'</sub>-Position. So war der p<sup>-1</sup>-Wert für das Pentapeptid im Fall von ~L-Phe~ um das 6-fache (434 M<sup>-1</sup>) bzw. im Fall von ~D-Phe~ um das 9-fache (74 M<sup>-1</sup>) im Vergleich zum Aminosäureamid verringert. Dieser beobachtete Effekt verstärkte sich im Fall von Bz-Gly-OGp als Acyldonor. So wurde *all*-L-Phe-Ala-Ala-Ala-Gly im Vergleich zum korrespondierenden Aminosäureamid etwa 8-fach (172 M<sup>-1</sup>) bzw. im Fall des D-Stereoisomers 177-fach (17,6 M<sup>-1</sup>) schlechter als Acylakzeptor umgesetzt.

Neben dieser allgemeinen Verringerung der p<sup>-1</sup> wies der S<sub>1'</sub>-Substratbindungsort eine allgemein höhere Spezifität gegenüber *all*-L-Peptiden auf, was im Fall von Peptiden auf eine erhöhte L-Stereoselektivität hinwies. Zudem wird deutlich, dass Peptide, welche L/D-Arg an P<sub>1'</sub> besaßen, im Vergleich zu anderen Aminosäuren an dieser Position höhere p<sup>-1</sup>-Werte erreichten (Bz-D-Phe-OMe/*all*-L/D-Arg-Ala-Ala-Ala-Gly: 146 M<sup>-1</sup>/49,3 M<sup>-1</sup>). Somit ließ sich feststellen, dass der S<sub>1'</sub>-Substratbindungsort der ADP eine erhöhte Spezifität für L-Phe- und L-Arg-enthaltende Peptide und Substrate aufwies (**Tab. 3.2**).

Bei Betrachtung der p<sup>-1</sup>-Werte unter Verwendung von Bz-Gly-OGp als Acyldonor hinsichtlich der S<sub>2'</sub>- und S<sub>3'</sub>-Substratbindungsortspezifitäten folgten diese beim Umsatz dem allgemeinen Trend der S<sub>1'</sub>-Substratbindungsortspezifität (**Tab. 3.2**). Die höchsten p<sup>-1</sup>-Werte werden mit L-Phe (172 M<sup>-1</sup>) und L-Arg (92 M<sup>-1</sup>) an P<sub>2'</sub>-Position und L-Met (94 M<sup>-1</sup>) und L-Arg (86 M<sup>-1</sup>) an Position P<sub>3'</sub> erreicht. Im Gegensatz zu den *all*-L-Peptiden wurde der größte Teil der *all*-D-Peptide hingegen nicht akzeptiert. Eine Ausnahme bildete lediglich *all*-D-Ala-Ala-Arg-Ala-Gly, welches einen p<sup>-1</sup>-Wert von 135 M<sup>-1</sup> aufwies. Die Analyse der Acyltransferreaktionen mit Bz-D-Phe-OMe als Acyldonor und *all*-L-Peptiden als Acylakzeptoren zeigte einen höheren Umsatz im Vergleich zu *all*-D-Peptiden (**Tab. 3.2**). Dabei konnten für L-Arg-beinhaltende Peptide (S<sub>2'</sub>: 52 M<sup>-1</sup> / S<sub>3'</sub>: 85 M<sup>-1</sup>) erneut die höchsten p<sup>-1</sup>-Werte ermittelt werden.

**Tab. 3.3 Akzeptanz von Arg- und Phe-beinhaltenen *all*-L-Pentapeptidnukleophilen der ADP.**

Acylakzeptor	reziproker Partitionswert p <sup>-1</sup> (M <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	
	Bz-Gly-OGp	Bz-D-Phe-OMe
Arg-Arg-AAG	n. d. <sup>b</sup>	n. d.
Arg-Phe-AAG	206,6	n. d.
Phe-Arg-AAG	436,7	88,8
Phe-Phe-AAG	337,0	185,1

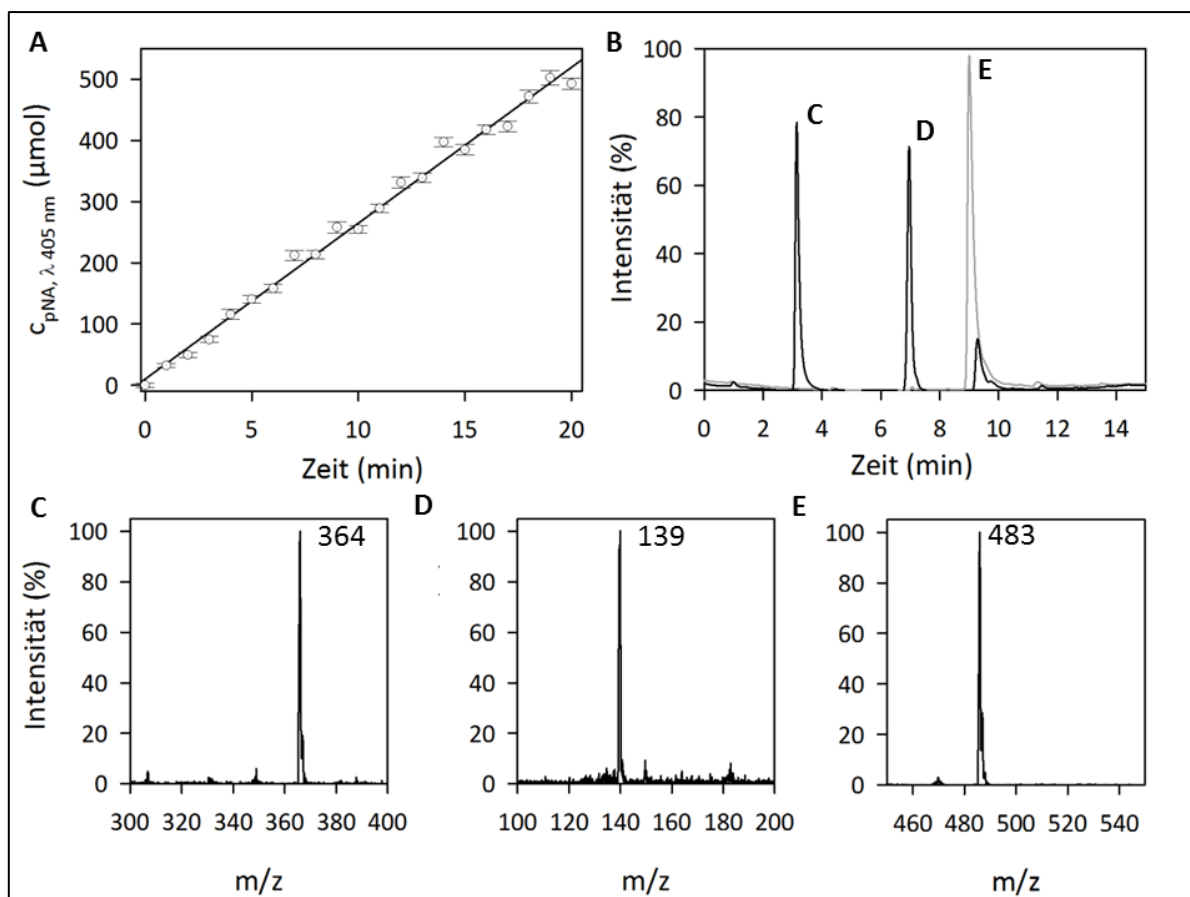
<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: 100 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 7 % (v/v) DMSO, 1 mM Bz-D-Phe-OMe/Bz-Gly-OGp, 10 mM Peptide, 0,01 – 1 µM ADP. / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels HPLC (variable Gradienten, 15 min, λ 254 nm). Die Messabweichung betrug < 10 %.

<sup>b</sup> n. d. - Ein Umsatz konnte nicht detektiert werden.

Ausgehend von der ermittelten Präferenz der ADP gegenüber L-Phe und L-Arg im  $S_1'$  bzw.  $S_2'$ -Bindungsort wurde eine zweite Pentapeptidbibliothek, welche die beiden Aminosäuren an  $P_1'$ - und  $P_2'$ -Position kombiniert, synthetisiert und als Acylakzeptoren verwendet (**Tab. 3.3**). Hierbei wurde deutlich, dass Peptide, welche L-Arg an Position  $P_1'$  tragen, deutlich schlechter akzeptiert wurden, als Peptide mit L-Phe an dieser Position. Bemerkenswert war zudem, dass sterisch anspruchsvolle Peptide wie *all*-L-Phe-Arg-Ala-Ala-Gly ( $p^{-1}$ -Wert  $437 \text{ M}^{-1}$ ) und *all*-L-Phe-Phe-Ala-Ala-Gly ( $p^{-1}$ -Wert  $337 \text{ M}^{-1}$ ) sehr gut als Nukleophile akzeptiert wurden.

### 3.1.2 Reaktivität der ADP gegenüber Abz-D-Arg-D-Ala-pNA

Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität von D-Aminosäure-haltigen Substraten (**Tab. 3.1**) wurde in der Folge die spezifische Aktivität der ADP gegenüber dem IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-pNA durch Bestimmung der hydrolytischen Aktivität untersucht (**Abb. 3.1**).

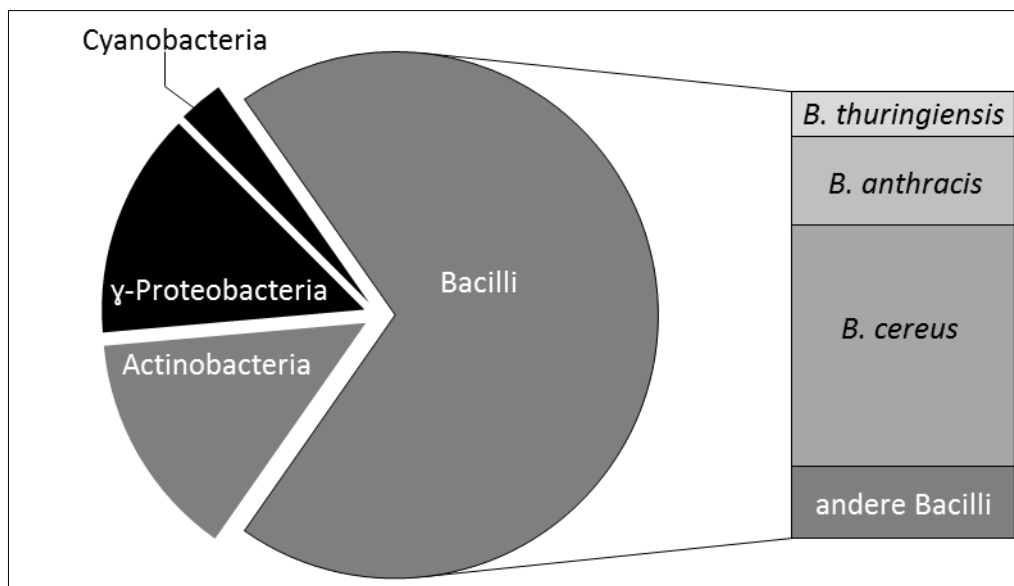


**Abb. 3.1 Nachweis proteolytischer Aktivität der ADP gegenüber Abz-D-Arg-D-Ala-pNA.** Dargestellt ist die proteolytische Aktivität der ADP gegenüber dem Substrat Abz-D-Arg-D-Ala-pNA (**A**). Die spezifische Aktivität wurde mittels linearer Regression mit  $3,6 \text{ kat mol}^{-1}$  bestimmt. Weiterhin ist die HPLC Analyse der Reaktion (**B**) zum Zeitpunkt 0 min (in Grau) und 60 min (in Schwarz) dargestellt. Die Identifizierung der Spaltprodukte Bz-D-Arg-D-Ala-OH (**C**), pNA (**D**) sowie des Substrates Abz-D-Arg-D-Ala-pNA (**E**) erfolgte mittels Massenspektrometrie. /Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 8,0), 1 % (v/v) DMF, 1 mmol Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 1,25  $\mu\text{mol}$  ADP, 30 °C,  $\lambda$  405 nm / Die Analyse der Reaktionen/Produkte erfolgte mittels HPLC/LC-MS (Gradient: 10 auf 60 % ACN, 15 min,  $\lambda$  254 nm).



Durch Freisetzung von *p*-Nitroanilin wurde die gekennzeichnete hydrolytische Reaktivität der ADP festgestellt. Diese erfolgte mit einer spezifischen Aktivität von  $3,6 \text{ kat mol}^{-1}$  gegenüber dem IQFS (**Abb. 3.1 A**). Zur Verifizierung dieser Reaktion wurde der Verlauf der Hydrolyse mittels HPLC verfolgt. So entstanden aus dem zu Beginn der Reaktion (**Abb. 3.1 B** – graue Linie) vorliegendem IQFS mit einer Retentionszeit von 9,2 Min. zwei Spaltprodukte mit Retentionszeiten von 3,2 min und 7,1 min (**Abb. 3.1 B** – schwarze Linie). Mittels LC/MS-Analysen konnten den Peaks in der Folge das Substrat Abz-D-Arg-D-Ala-*p*NA ( $m_{\text{ber}} 481$ ,  $m/z_{\text{best}} 483$  (**3.1 E**)) und die Spaltprodukte Abz-D-Arg-D-Ala-OH ( $m_{\text{ber}} 362$ ,  $m/z_{\text{best}} 364$  (**3.1 C**)) sowie *p*NA ( $m_{\text{ber}} 138$  -  $m/z_{\text{best}} 139$  (**3.1 D**)) zugeordnet werden. Damit war die hydrolytische Aktivität der ADP, welche das Substrat C-terminal von Abz-D-Arg-D-Ala-OH spaltet, bestätigt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das IQFS *in vitro* mit zuvor gereinigtem Enzym anwendbar ist, stand es im Folgenden im Fokus, enzymatische Aktivitäten D-stereospezifischer Peptidasen und Proteasen (DSP) in biologischen Proben nachzuweisen. Da das Gen der ADP aus der genomischen DNA des S2-Organismus *B. cereus* isoliert wurde, war es nicht möglich, einen direkten Nachweis der nativen Aktivität dieses Enzyms im Bakterium durchzuführen. Um dennoch die Möglichkeit einer breiteren Anwendung des IQFS hinsichtlich der Detektion und Zuordnung nativer DSP in Organismen zu untersuchen und um einen gegebenenfalls besseren bis dato unbekanntem Biokatalysator für die Peptidfragmentligation zu identifizieren, wurde eine *in silico* Studie mit dem Ziel durchgeführt, ein verwandtes Enzym in einem geeigneten alternativen Organismus zu identifizieren.



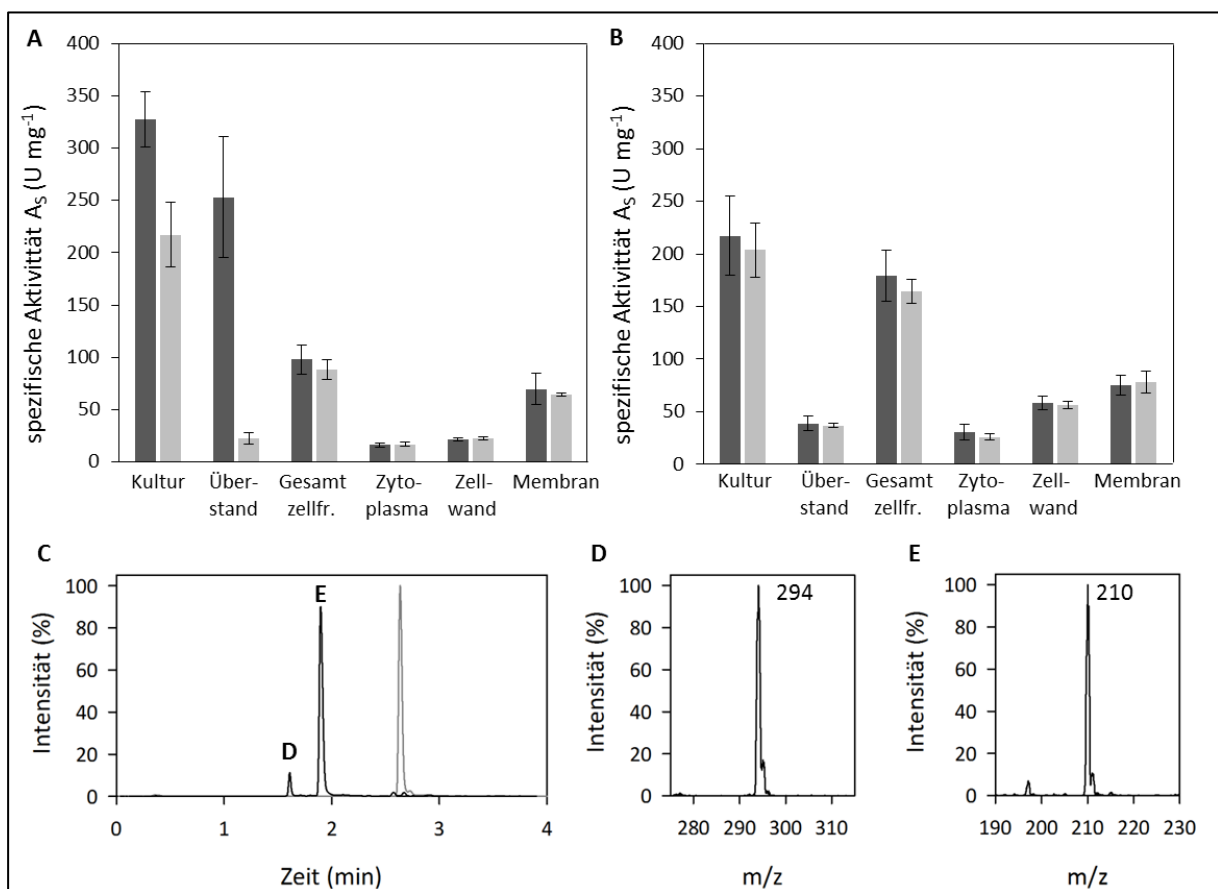
**Abb. 3.2 Übersicht über die Distribution ADP-ähnlicher Proteasen.** Die Verteilung ADP ähnlicher Enzyme ist als Kuchendiagramm dargestellt. Von insgesamt 72 homologen Proteasen sind 12 in Gram-negativen Organismen apparent (dargestellt in Schwarz), während die übrigen 60 in Gram-positiven Organismen auftreten (dargestellt in Grau). Hierbei tritt die Mehrzahl in der Gruppe der Bacilli auf (dargestellt als Stapeldiagramm). Die Auswertung erfolgte mit eggNOG3.0 auf Grundlage der Sequenz der ADP (Uniprot-ID: P94288) (Powell *et al.*, 2012).

Hierfür wurde das Programm eggNOG3.0 mit der verkürzten Proteinsequenz der ADP genutzt (Uniprot-ID: P94288/ **Abb. 3.2**) (Asano *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 2012). Das Ergebnis dieser Studie ergab insgesamt 72 mögliche Zielproteine in verschiedenen Organismen. Dabei sind 12 ADP-ähnliche Zielproteine im Genom Gram-negativer Organismen kodiert (2 in Cyanobacteria, 10 in  $\gamma$ - Proteobacteria/ **Abb. 3.2** in Schwarz). Die restlichen 60 vorgeschlagenen Zielproteine fallen auf Gram-positive Organismen (10 in Actinobacteria, 50 in Bacilli/ **Abb. 3.2** in Grau). Innerhalb der Klasse der Bacilli wurden fünf putativ ADP-ähnliche Zielproteine im als S1 klassifizierten Organismus *B. thuringiensis* verortet. Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurde daher in der Folge Das Bakterium *Bacillus thuringiensis* serovar Berliner 1915 für die Anwendung der nativen Detektion ADP-ähnlicher Enzyme mit Hilfe des IQFS verwendet.

### 3.1.3 Detektion und Identifizierung proteolytischer Aktivität in *Bacillus*-Stämmen

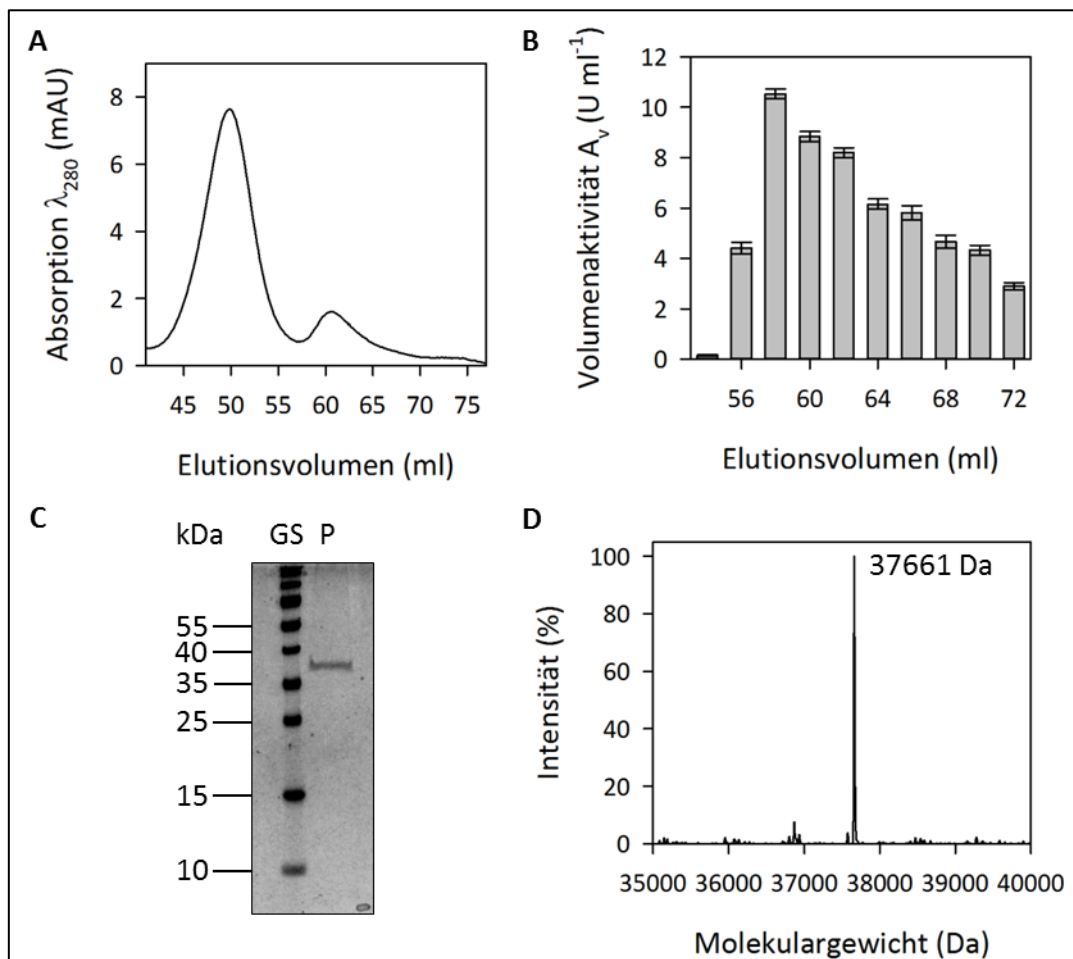
Um die hydrolytische Aktivität vorhergesagter DSP direkt in Organismen nachzuweisen, wurden *B. thuringiensis* und *B. subtilis* auf das Vorhandensein selbiger mit Hilfe des IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-pNA untersucht. Die Auswahl der Stämme erfolgte dabei gemäß der bioinformatischen Studie, welche für *B. thuringiensis* ein Vorhandensein von homologen DSP und für *B. subtilis* keine DSP vorhersagte, um im Folgenden als Negativkontrolle zu fungieren. Nach Anzucht beider Stämme bis zum Erreichen der mittleren stationären Phase wurden beide fraktioniert und die so erhaltenen Proben acht Stunden bei RT mit dem IQFS inkubiert. Im Folgenden wurde sowohl die Fluoreszenz, welche jegliche proteolytische Aktivität unabhängig von der Spaltposition im Molekül nachwies (**Abb. 3.3 A und B** in Dunkelgrau) und die Absorption, welche durch C-terminale Abspaltung der pNA-Gruppe entstand, vermessen (**Abb. 3.3 A und B** in Hellgrau). Die Analyse der Gesamtkulturfraktionen, bestehend aus aufgeschlossenen Zellen und dem Kulturüberstand, wies in beiden Stämmen eine Aktivität gegenüber dem IQFS auf (**Abb. 3.3 A und B**). Durch Auswertung der Aktivitäten in *B. thuringiensis* wurde ein Unterschied zwischen der gemessenen spezifischen Aktivität durch Fluoreszenz ( $327 \text{ mU g}^{-1}$ ) und der durch Absorption bestimmten ( $217 \text{ mU g}^{-1}$ ) deutlich. Diese Diskrepanz deutet auf eine N- oder C-terminale proteolytische Aktivität gegenüber dem im IQFS enthaltenen D-Arginin hin. Im Vergleich war diese durch DSP hervorgerufene spezifische Aktivität in *B. subtilis* nicht detektierbar. In beiden Fällen lagen die detektierten Aktivitäten innerhalb ähnlicher Größenordnungen (Fluoreszenz:  $219 \text{ mU g}^{-1}$  / Absorption:  $203 \text{ mU g}^{-1}$ ). Um die spezifischen Aktivitäten näher zu lokalisieren und die D-Arginin-spezifische DSP zu isolieren, wurden die Kulturen im Folgenden fraktioniert. Es wurde festgestellt, dass die Hauptaktivität in *B. subtilis* innerhalb der Bakterienzellen und dort insbesondere in der Zellwand- ( $58 \text{ mU g}^{-1}$ ) sowie Membranfraktion ( $74 \text{ mU g}^{-1}$ ) lokalisiert war. Ein Vergleich dieser spezifischen Aktivitäten mit denen der Fraktionen von *B. thuringiensis* zeigt, dass die Aktivität der Membranfraktion mit  $69 \text{ mU g}^{-1}$  in einer ähnlichen Größenordnung lag, während die Aktivität in der Zellwand deutlich reduziert war

(22 mU g<sup>-1</sup>). Die Analyse der Kulturüberstände beider Kulturen zeigte deutliche Unterschiede. So wies der Kulturüberstand von *B. thuringiensis* eine deutlich erhöhte Fluoreszenzaktivität von 253 mU g<sup>-1</sup> auf, was für das Vorhandensein einer neuartigen DSP in dieser Fraktion sprach. Die erhöhte hydrolytische Fluoreszenzaktivität der DSP im Kulturüberstand kann entweder aus einer C- oder einer N-terminalen Spaltung des Arginins innerhalb des IQFS resultieren. Um die hydrolysierte Bindung zu identifizieren, wurden daher HPLC- und LC/MS-Studien durchgeführt (**Abb. 3.3 C-E**). Zu Beginn der Reaktion wurde ausschließlich das Substrat Abz-D-Arg-D-Ala-pNA mit einer Retentionszeit von 2,63 min detektiert (**Abb. 3.3 C**, graue Linie), aus welchem nach acht stündiger Inkubation zwei neue Signalpeaks mit Retentionszeiten bei 1,62 min bzw. 1,89 min (**Abb. 3.3 C**, schwarze Linie/ indiziert durch *D* bzw. *E*) entstanden.



**Abb. 3.3 Lokalisierung der biologischen Aktivität gegenüber dem Abz-D-Arg-D-Ala-pNA innerhalb zweier verschiedener Bacilli-Stämme.** Kulturen von *B. thuringiensis* (**A**) sowie *B. subtilis* (**B**) wurden angezogen und wie beschrieben fraktioniert (**Kap. 2.2.4**). Zur Bestimmung der Aktivität wurden die Fraktionen jeweils mit 400 µM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA (1 % (v/v) DMF) inkubiert und der Umsatz nach 8 Stunden mittels Fluoreszenz (Dunkelgrau) und Absorption (Hellgrau) bezogen auf 1 mg Zellpellet bestimmt. Nach Abschluss der Messung wurde die Fraktion des Überstands mittels UPLC analysiert (**C**). Im Vergleich zum Substrat (Grau) konnten zwei neue Produkte identifiziert werden (Schwarz, **D** bzw. **E**). Diese Produkte konnten mit Hilfe von LC-MS-Analysen als Abz-D-Arg-OH (**D**) und NH<sub>2</sub>-D-Ala-pNA (**E**) identifiziert werden. / Reaktionsbedingungen: 400 µM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 1 % (v/v) DMF, 30 °C, Absorption: λ 405 nm, Fluoreszenz: λ<sub>ex</sub> 320 nm, λ<sub>em</sub> 420 nm/ Die Analyse der Reaktionen bzw. Produkte erfolgte mittels HPLC/LC-MS (Gradient: 10 auf 60 % ACN, 3 Min., λ 254 nm)

Im Folgenden wurden die Fraktionen massenspektrometrisch untersucht und konnten als Abz-D-Arg-OH ( $m_{\text{ber}} 293 / m/z_{\text{best}} 294$ ) und  $\text{NH}_2$ -D-Ala-pNA ( $m_{\text{ber}} 209 / m/z_{\text{best}} 210$ ) identifiziert werden (**Abb. 3.3 D-E**). Die neu identifizierte DSP konnte somit initial als D-Arg-spezifische Endopeptidase beschrieben werden. Nachdem die DSP im Überstand detektiert werden konnte, wurde folgend der Überstand aus einer mit *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 inokulierten 12 L-Kultur aufgearbeitet. Die Reinigung erfolgt im ersten Schritt mittels Kationenaustauschchromatografie. Nach Elution wurden die DSP-haltigen Fraktionen mit Hilfe des IQFS identifiziert und vereinigt. In einem zweiten Reinigungsschritt erfolgte eine Größenausschlusschromatografie (**Abb. 3.4 A**). Wiederum wurden die DSP-haltigen Fraktionen mit Hilfe des IQFS identifiziert (**Abb. 3.4 B**). Dabei konnte im Bereich des Elutionsvolumen von 54 bis 72 ml eine Fluoreszenzaktivität bis zu  $11 \text{ U ml}^{-1}$  festgestellt werden.

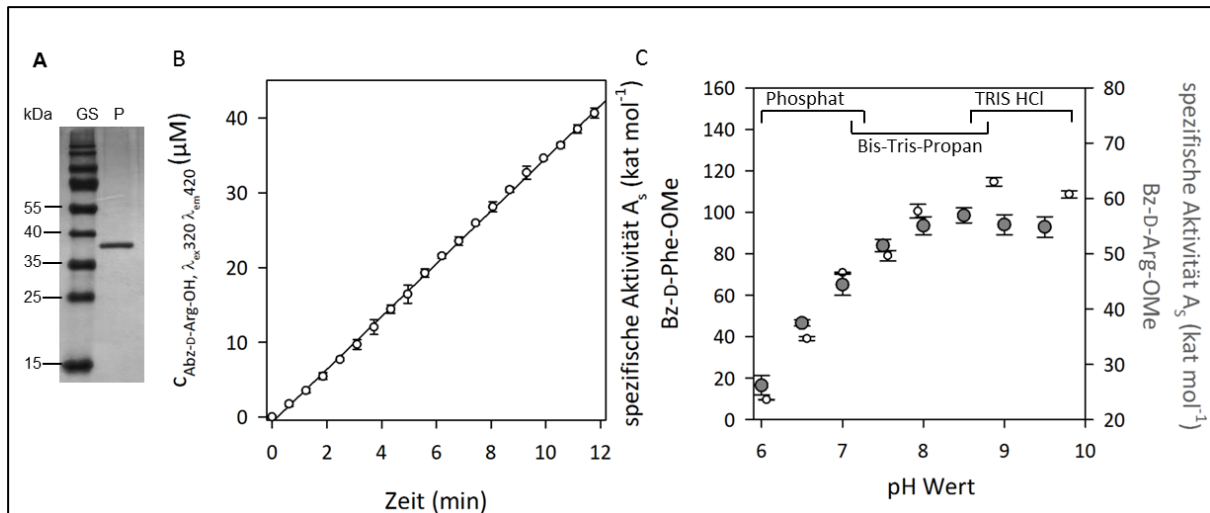


**Abb. 3.4 Isolation der D-stereospezifischen Peptidase aus *B. thuringiensis*.** Der Überstand von 12 l einer *B. thuringiensis*-Kultur (NB-Medium) wurde wie beschrieben aufgearbeitet (**Kap. 2.4.1**). Nach der Größenausschlusschromatografie (**A**) wurde die Volumenaktivität durch Messung der Fluoreszenz (**B**) bestimmt. Nach Vereinigung und Konzentrierung der Fraktionen 56 bis 72 ml wurde die Probe sowohl gelelektrophoretisch (**C**) als auch massenspektrometrisch (**D**) untersucht. Das Protein konnte als D-stereospezifische Hydrolase (Uniprot-ID: C3FM16) identifiziert werden. /Reaktionsbedingungen:  $400 \mu\text{M}$  Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 1 % (v/v) DMF,  $30^\circ\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} 320 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} 420 \text{ nm}$  / Elektropherogramm: 12,5 % (w/v) SDS-PAGE, Silberfärbung, PageRuler Prestained Ladder (GS), konzentrierte Fraktionen (P).

Nach Vereinigung und Konzentrierung wurden die Proben sowohl gelelektrophoretisch, massenspektrometrisch als auch auf die spezifische Aktivität hin untersucht. Dabei konnte mittels Silberfärbung eine einzelne Migrationsbande bei etwa 37 kDa angefärbt werden (**Abb. 3.4 C**). Zudem wurde die spezifische Fluoreszenzaktivität des Proteins mit  $8,3 \text{ U mg}^{-1}$  bestimmt. Die massenspektrometrische Analyse zeigte eine molekulare Masse von 37661 Da (**Abb. 3.4 D**). Zudem wurde die N-terminale Aminosäuresequenz SSLQTSTQSDR mit Hilfe einer Fragmentanalyse identifiziert, so dass das Protein gemäß BLAST-Analyse als D-stereospezifische Hydrolase (dHy) aus *B. thuringiensis* identifiziert werden konnte (Uniprot-ID: C3FM16 (Speicher *et al.*, 2009)).

### 3.1.4 Charakterisierung der Substratspezifität der dHy aus *B. thuringiensis*

Homologiestudien zur Sequenz der dHy legten den Schluss nahe, dass das Enzym ein Vertreter der **Low Molecular Mass** (LMM)-Penicillin-bindenden Proteine (PbP) ist (Nemmara *et al.*, 2011). Die Analyse zeigte zudem verglichen zur ADP aus *B. cereus* einen hohen **Protein Weight Matrix Score** (PWMS) von 82 %, was auf die Akzeptanz und den Umsatz von D-Aminosäure-haltigen Substraten schließen ließ (Wheeler, 2002). Vergleiche mit Vertretern der LMM-PbP, bei welchen wenig bzw. keine proteolytische Aktivität nachweisbar war, wiesen hingegen geringere PWMS-Werte auf, während die **strukturelle Abdeckung** (StA) gleichzeitig hoch war (Kelley *et al.*, 2015). So besitzt die dHy einen PWMS von 34,5 % / 22 % und eine hohe StA (Res. 10-344, PDB-ID: 1IKG / Res. 7-344, PDB-ID: 4GDN) im Vergleich zur DD-Peptidase aus *Streptomyces sp.* R61 beziehungsweise zu ClbP aus *Staphylococcus aureus* N315 (McDonough *et al.*, 2002; Coughnoux *et al.*, 2012). Ausgehend von diesen Ergebnissen und dem guten Umsatz D-Arginin-haltiger Substrate sollte die dHy somit eine ergänzende Alternative zur ADP darstellen. In der Folge wurde das Gen kloniert und heterolog im Zytoplasma in *E. coli* synthetisiert. Aufgrund des isoelektrischen Punkts des Proteins von 8,2 wurde eine Zweistufenreinigung mit Verzicht auf Affinitätsfusionstranskripte etabliert. Nach dieser Reinigung (**Kap. 2.4.2**) konnte die dHy mit einer Ausbeute von 19 bis 25 mg/l<sub>Kultur</sub> erhalten werden. Durch gelelektrophoretische und HPLC/MS-spektrometrische Analyse konnte eine hohe Reinheit des Proteins ermittelt werden (**Abb. 3.5 A** / MS Daten nicht gezeigt). In der Folge wurde initial die Aktivität gegenüber dem IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-pNA mit  $3,3 \text{ kat mol}^{-1}$  bestimmt (**Abb. 3.5 B**). Zur Bestimmung der Substratbindungs-ortspezifitäten sowie zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde die pH-Abhängigkeit der dHy ermittelt. Hierfür wurde die Spaltung des Substrates Bz-D-Phe/D-Arg-OMe in Bz-D-Phe/D-Arg-OH in Abhängigkeit verschiedener pH-Werten verfolgt. Das Enzym wies dabei mit beiden Substraten die höchste Aktivität zwischen pH 8,0 und 10,0 auf und zeigte seine maximale spezifische Aktivität bei pH 9,0 mit  $116 \text{ kat mol}^{-1}$  (Bz-D-Phe-OMe / **Abb. 3.5 C**, Schwarz) bzw. pH 8,5 mit  $54 \text{ kat mol}^{-1}$  (Bz-D-Arg-OMe / **Abb. 3.5 C**, Grau).



**Abb. 3.5 Analyse und initiale Charakterisierung der dHy aus *B. thuringiensis*.** Das Gen C3FM16 wurde wie beschrieben kloniert und in *E. coli* synthetisiert. Nach Reinigung, Vereinigung und Konzentration der proteinhaltigen Fraktionen wurde die Probe sowohl gelelektrophoretisch (A) als auch hinsichtlich ihrer Aktivität analysiert (B). Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Proteinaktivität vom pH-Wert untersucht und ein Optimum zwischen pH 8,5 und 10 bestimmt (C). /Reaktionsbedingungen: 0,1 M Na-Phosphat-Puffer (pH 8,0 / 6,0 – 8,0), 0,1 M Bis-Tris-Propan (pH 8,0 – 9,0), 0,1 M Tris/HCl (pH 9,0 – 10,0), 1 % (v/v) DMF, 2 mM Bz-D-Phe-OMe (Schwarz) / Bz-D-Arg-OMe (Grau)/ 100  $\mu$ M Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 50 nM dHy, 30 °C, Fluoreszenz:  $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm/ Elektropherogramm: 12,5 % (w/v) SDS-PAGE, Silberfärbung, PageRuler Prestained Ladder (GS), konzentrierte Fraktionen (P)/ Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC (Gradient: 5 auf 60 % ACN, 3 min,  $\lambda$  254 nm)

Da eine hohe Spontanhydrolyse von Estersubstraten mit zunehmenden pH-Wert zu erwarten war, wurden die folgenden Studien bei pH 8,0, bei welchem die maximale spezifische Aktivität auf etwa 82-88 % gesenkt war, durchgeführt.

Zur Bestimmung der Spezifität des  $S_1$ -Substratbindungsortes wurde erneut die Bz-D/L-Xaa-OMe-Substratbibliothek verwendet. Dabei erfolgte die Auswahl der Aminosäuren nach den gleichen Kriterien, die zur Bestimmung der  $S_1$ -Substratbindungsortspezifität der ADP verwendet wurden (Kap. 3.1.1). Bei Betrachtung des  $S_1$ -Aktivitätsprofils der dHy wird deutlich, dass das Enzym eine deutliche Präferenz für D-Aminosäuren aufwies (Tab. 3.4). So waren die spezifischen Aktivitäten für das D-Aminosäure-Stereoisomer im Fall von Phe (Bz-D-Phe-OMe: 101.000  $\text{mkat mol}^{-1}$ , Bz-L-Phe-OMe: 1,5  $\text{mkat mol}^{-1}$ ) und Trp (Bz-D-Trp-Me: 151.000  $\text{mkat mol}^{-1}$ , Bz-L-Trp-OMe: 0,7  $\text{mkat mol}^{-1}$ ) bis zu  $10^6$ -fach und im Fall von nicht-aromatischen Aminosäuren wie Alanin und Serin bis zu  $10^3$ -fach erhöht. Die Diskriminierung von Bz-L-Xaa-OMe-Substraten führte dazu, dass selbst das achirale Bz-Gly-OMe mit 47,5  $\text{mkat mol}^{-1}$  besser akzeptiert wurde. Zusätzlich wurde bei der Iminosäure Prolin kein Umsatz detektiert, was auf eine Diskriminierung zwischen Amino- und Iminofunktionen hinweist.

Beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten für Bz-D-Xaa-OMe-Substrate wurde deutlich, dass die dHy eine scheinbar hohe Selektivität zu aromatischen Aminosäuren sowie D-Arginin (55,0  $\text{kat mol}^{-1}$ ) aufwies, während die übrigen Aminosäuren nur schlecht bzw. gar nicht akzeptiert wurden.

Tab. 3.4 Bestimmung der S<sub>1</sub>- und S<sub>1</sub>'-Bindungsortspezifität der dHy.<sup>2</sup>

	Bz-D/L-Xaa-OMe spezifische Aktivität A <sub>s</sub> (mkat mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Amino- säure (Xaa)	reziproker Partitionswert p <sup>-1</sup> (M <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>		
			Acyldonor (siehe unten) / Bz-D-Phe-OMe	Acylakzeptor: D/L-Xaa-NH <sub>2</sub> Bz-Gly-OGp	Bz-D-Arg-OMe
D-Stereoisomer	100.580	Phe	42,4	79,2	36,1
	150.970	Trp <sup>c</sup>	n. b. <sup>d</sup>	n. b.	n. b.
	55.070	Arg	16,4	33,0	36,1
	47.180	Tyr	n. b.	n. b.	n. b.
	31.930	His	n. b.	n. b.	n. b.
	15.270	Met	31,6	68,2	18,2
	1.230	Ala	6,3	15,3	4,0
	n. b.	Leu	38,7	222	38,4
	1.090	Ser	4,8	7,5	6,0
	530	Val	n. b.	n. b.	n. b.
	47,5	Glu	2,9	3,8	1,2
	n. b.	Asn	4,8	15,0	<1
	n. d. <sup>e</sup>	Pro	n. d.	27,4	n. d.
	47,5	Gly	16,4	16,7	3,0
L-Stereoisomer	1,46	Phe	8,5	8,9	2,8
	0,66	Trp	n. b.	n. b.	n. b.
	3,51	Arg	1,8	4,8	n. d.
	1,72	Tyr	n. b.	n. b.	n. b.
	2,18	His	n. b.	n. b.	n. b.
	0,62	Met	110,0	81,5	147
	0,08	Ala	3,2	4,1	<1
	n. a.	Leu	3,6	9,4	<1
	0,79	Ser	2,9	7,8	1,8
	n. d.	Val	n. b.	n. b.	n. b.
	n. b.	Asn	2,4	4,1	n. d.
	0,20	Glu	2,9	3,5	n. d.
	n. d.	Pro	n. d.	23,0	n. d.

Reaktionsbedingungen: 100 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,01 – 5 µM dHy, <sup>a</sup> 2 mM Bz-D/L-Xaa-OMe, <sup>b</sup> 2 mM Bz-D-Phe-OMe/Bz-Gly-OGp/Bz-D-Arg-OMe, 20 mM D/L-Xaa-NH<sub>2</sub> / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC (variable Gradienten, 3 Min., λ 254 nm). Die Messabweichung betrug <sup>a</sup>< 5 % bzw. <sup>b</sup>10 %. /<sup>c</sup> 5 % (v/v) DMF wurden verwendet /<sup>d</sup>n. b. – Das Substrat wurde nicht berücksichtigt. /<sup>e</sup>n. d. - Ein Umsatz konnte nicht detektiert werden.

In den folgenden Untersuchungen der S<sub>1</sub>'-Substratbindungsortspezifität wurde auf die Verwendung von D-Tryptophan-haltigen Substraten verzichtet, da diese aufgrund der geringen Löslichkeit in 5 % (v/v) DMF gelöst werden mussten, was eine Reduktion der spezi-

<sup>2</sup> Teile der Ergebnisse der hier dargestellten Daten wurden im Rahmen der betreuten Diplomarbeit von Claudia Rößler und Bachelorarbeit von Philip Lössl generiert.

fischen Aktivität um 52 % bewirkte. Daher wurden in den Modellacyltransferreaktionen zur Bestimmung der  $S_1'$ -Substratbindungsortspezifität die Methylester Bz-D-Phe-OMe und Bz-D-Arg-OMe sowie das Substratmimetikum Bz-Gly-OGp verwendet, welches die Strukturen von Arg und Phe in seiner Abgangsgruppe vereinte. Als Acylakzeptoren wurde eine D/L-Aminosäureamid-Bibliothek verwendet, wobei die Auswahl der verwendeten Amide analog der Bestimmung der  $S_1'$ -Substratbindungsortspezifität der ADP erfolgte (**Kap. 3.1.1**).

Im Gegensatz zum  $S_1$ -Aktivitätsprofil der dHy, welches eine klare Präferenz für aromatische D-Aminosäuren aufwies, variierte die Akzeptanz der Nukleophile im  $S_1'$ -Substratbindungsort zum Teil in Abhängigkeit vom verwendeten Acyldonor (**Tab. 3.4**). Die Acyltransferreaktionen mit Bz-D-Phe-OMe als Acyldonor zeigten keine klare Präferenz für D- oder L- Stereoisomere der Aminosäureamide. So wurde D-Met-NH<sub>2</sub> mit einem  $p^{-1}$ -Wert von 110 M<sup>-1</sup> am besten akzeptiert, gefolgt vom Stereoisomer L-Met-NH<sub>2</sub> mit 32 M<sup>-1</sup> sowie von Aminosäureamiden mit größeren Seitenketten wie D-Phe-NH<sub>2</sub> (42 M<sup>-1</sup>) und D-Leu-NH<sub>2</sub> (39 M<sup>-1</sup>).

Wurde Bz-D-Arg-OMe als Acyldonor verwendet, änderten sich die  $p^{-1}$ -Werte der Aminosäureamide (**Tab. 3.4**) nur marginal, wobei das Enzym mit Ausnahme von L-Met-NH<sub>2</sub> (147 M<sup>-1</sup>) eine Tendenz zu D-Aminosäureamiden zeigte. Dabei folgte die Akzeptanz der Amide einer ähnlichen Reihenfolge, wie sie bei Bz-D-Phe-OMe als Acyldonor beobachtet wurde. So konnten für die Aminosäure-Amide von D-Phe und D-Leu ein  $p^{-1}$ -Wert von 36 M<sup>-1</sup> bzw. 38 M<sup>-1</sup> berechnet werden. Zudem wurde D-Arg-NH<sub>2</sub> mit 36 M<sup>-1</sup> etwas besser akzeptiert.

Das Profil der Akzeptanz von Nukleophilen änderte sich abermals kaum im Fall von Acyltransferreaktionen mit Bz-Gly-OGp als Acyldonor. Dabei wurde D-Leu-NH<sub>2</sub> mit einem  $p^{-1}$  von 222 M<sup>-1</sup> am besten akzeptiert. Es folgten L-Met-NH<sub>2</sub> (81,5 M<sup>-1</sup>), D-Phe-NH<sub>2</sub> (79 M<sup>-1</sup>) und D-Met-NH<sub>2</sub> (68 M<sup>-1</sup>) in der Akzeptanz. Eine Besonderheit stellten Acyltransferreaktionen von Bz-Gly-OGp und D/L-Pro-NH<sub>2</sub> dar, bei welchen beide Aminosäureamide als Nukleophil akzeptiert wurden (L-Pro-NH<sub>2</sub>: 27 M<sup>-1</sup>, D-Pro-NH<sub>2</sub>: 23 M<sup>-1</sup>).

Ergänzend zu den untersuchten Aminosäureamiden wurde der Acyltransfer von Substraten wie Di- und Pentapeptiden untersucht. Diese Substrate wurden jedoch im Fall von Bz-D-Phe/Arg-OMe nicht und im Fall von Bz-Gly-OGp nur sehr schlecht als Acyldonoren akzeptiert. Dies deutete daraufhin, dass die dHy im  $S'$ -Substratbindungsort räumlich limitiert war. Die variierenden Aufsbeuten der Modellacyltransferreaktionen der Aminosäureamide in Abhängigkeit zum jeweiligen Acyldonor zeigen, dass letztere bei einem Umsatz durch die dHy unterschiedliche katalytische Eigenschaften aufwiesen. Im Folgenden wurden daher sowohl für Bz-D-Phe-OMe, als auch für Bz-D-Arg-OMe die kinetischen Parameter bestimmt. Ergänzt wurde das Spektrum der untersuchten Aminosäuremethylester durch Bz-D-His-OMe, welches in seinem heterozyklischen System der Seitenkette die basischen Eigenschaften von Arginin mit den aromatischen Eigenschaften von Phenylalanin kombiniert (**Tab. 3.5**). Analysen der Wechselzahl  $k_{cat}$  wiesen für Bz-D-Phe-OMe im Vergleich zu den beiden anderen Substraten einen 3-fach höheren Wert von 166 s<sup>-1</sup> auf. Bei einer Betrachtung der Michaelis-



Konstante  $K_M$ , welche zumindest anteilig von der Bindung und damit die Affinität des Substrates bestimmt wird, war ein deutlicher Unterschied zwischen den Substraten feststellbar. So betrug der  $K_M$ -Wert für Bz-D-Arg-OMe 64  $\mu\text{M}$  und war im Vergleich zu den übrigen untersuchten Substraten, die einen  $K_M$ -Wert von etwa 2 mM aufwiesen, 30-fach verringert. Dies führte in der Folge zu einer Spezifitätskonstante  $k_{\text{cat}}/K_M$  von 890.000  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  für Bz-D-Arg-OMe, 79.000  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  für Bz-D-Phe-OMe und 32.000  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  für Bz-D-His-OMe. Es war damit festzustellen, dass die dHy im Allgemeinen eine Spezifität gegenüber den untersuchten Estern und im Speziellen gegenüber Substraten mit basischen Seitenketten besitzt.

**Tab. 3.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten der dHy für ausgewählte Methylester.**

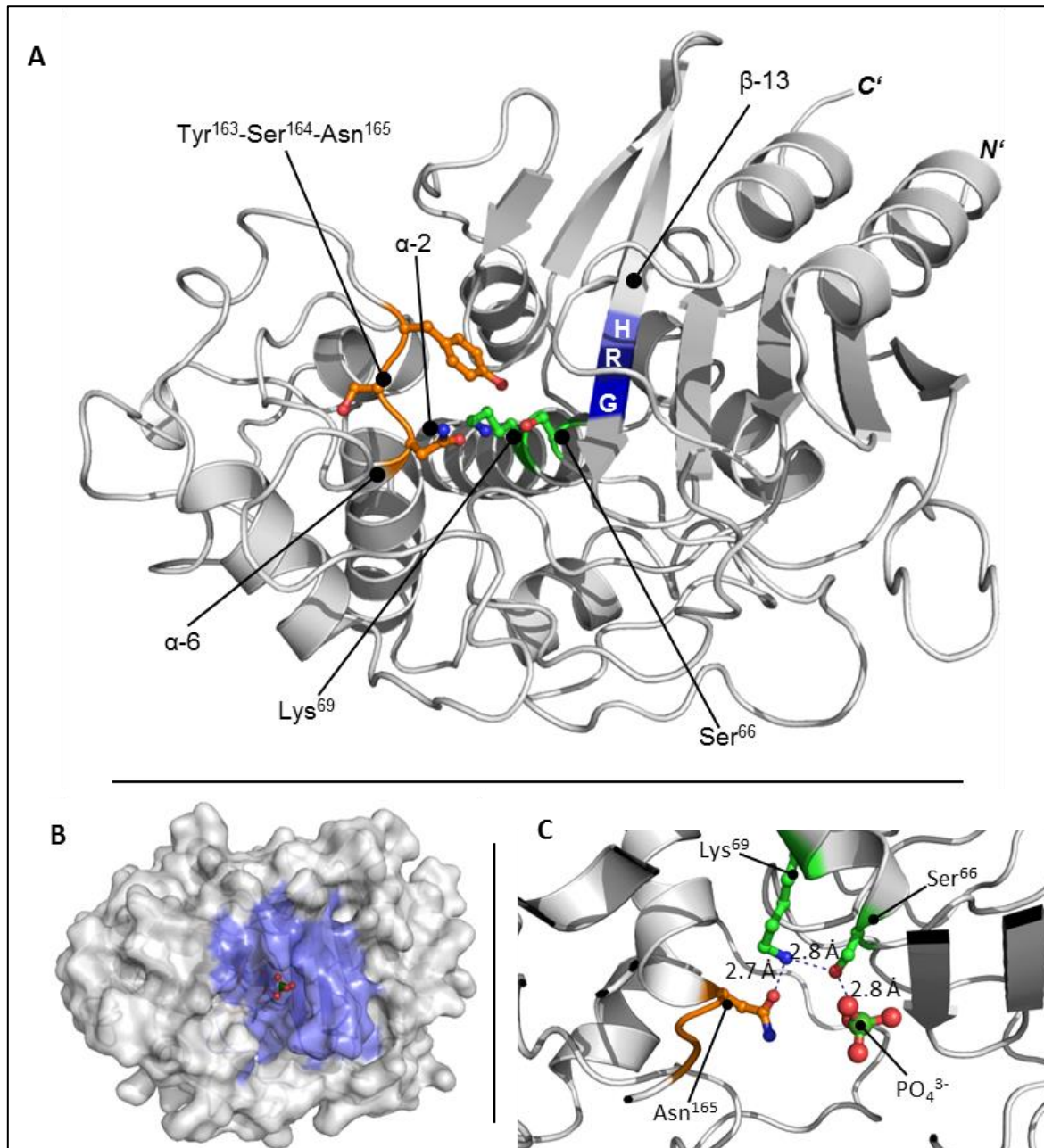
Bz-D-Xaa-OMe	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_M$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ )
Bz-D-Phe-OMe	165,8 ± 12,2	2,11 ± 0,22	78 600 ± 5 800
Bz-D-His-OMe	69,4 ± 3,3	2,17 ± 0,25	32 000 ± 1 500
Bz-D-Arg-OMe	57,1 ± 2,1	0,06 ± 0,01	890 000 ± 3 300

<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,01 – 5  $\mu\text{M}$  dHy, 10  $\mu\text{M}$  – 14 mM Bz-D-Xaa-OMe, / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC (variable Gradienten, 3 Min.,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug < 5 %.

### 3.1.5 Auflösung der Kristallstruktur der dHy aus *B. thuringiensis*

Aufgrund der hohen Akzeptanz gegenüber Bz-D-Arg-OMe, des synthetischen Potentials und der guten Verfügbarkeit der dHy wurden in der Folge Kristallisationsversuche unternommen. Hierfür wurde das Enzym wie beschrieben gereinigt (**Kap. 2.2.4 / Abb. 3.5**). Um Mikroaggregate bzw. Präzipitate zu vermeiden, wurde das Enzym in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 8,0 mit 0,1 M NaCl gepuffert, auf eine Endkonzentration von 8,5  $\text{mg ml}^{-1}$  konzentriert und bis zur Kristallisation auf Eis gelagert. Die Kristallisation selbst geschah durch die *Hanging Drop*-Methode bei konstant 20 °C in äquivalent gemischten Präzipitationspuffer (0,1 M Imidazol, 0,1 M MES, pH 6,5, 30 mM  $\text{CaCl}_2$  12,5 % (w/v) PEG 1000, 12,5 % (w/v) PEG 3350), wobei es nach circa 14 bis 21 Tagen zur Kristallbildung kam. Die so erhaltenen Kristalle wurden in der Folge schockgefroren und bei -173 °C am Bessy-Synchrotron vermessen. Die Struktur konnte durch *Molecular Replacement* mit Hilfe der DD-Peptidase aus *Streptomyces sp.* R61 (PDB-ID: 1PWD) gelöst werden (Silvaggi *et al.*, 2005). Dabei wurde zunächst die Liganden-freie Kristallstruktur der dHy mit 1,46 Å und einem finalen  $R_{\text{free}}$ -Wert von 0,178 aufgelöst. Der *Root Mean Square Deviation* (RMSD)-Wert betrug für die  $\text{C}^\alpha$ -Atome von Arg<sup>12</sup> bis Ser<sup>346</sup> von Monomer A und B 0,346 Å. In der Struktur war festzustellen, dass sich zwei Monomere in einer asymmetrischen Einheit (Kette A und Kette B) befanden. In Kette A (Monomer 1) konnte dabei eine Elektronendichte von Aminosäure Arg<sup>12</sup> bis Lys<sup>347</sup> aufgenommen werden. Gleichzeitig konnte im Bereich Leu<sup>221</sup> bis Leu<sup>227</sup> keine Elektronendichte detektiert werden. Ein ähnliches Phänomen konnte in Kette B (Monomer 2) beobachtet

werden, wobei hier der Bereich zwischen Leu<sup>221</sup> bis Leu<sup>227</sup> eine schwache Elektronendichte aufwies, weshalb Kette B daher nahezu komplett aufgelöst werden konnte. Zudem war für beide monomeren Einheiten eine Interaktionsfläche von 952 Å bestimmbar (Krissinel & Henrick, 2007). Durch Größenausschlusschromatografie konnte gezeigt werden, dass die dHy in Lösung als Monomer auftritt und die Dimerisierung vermutlich als Artefakt durch die Bedingungen während der Kristallisation entstand.



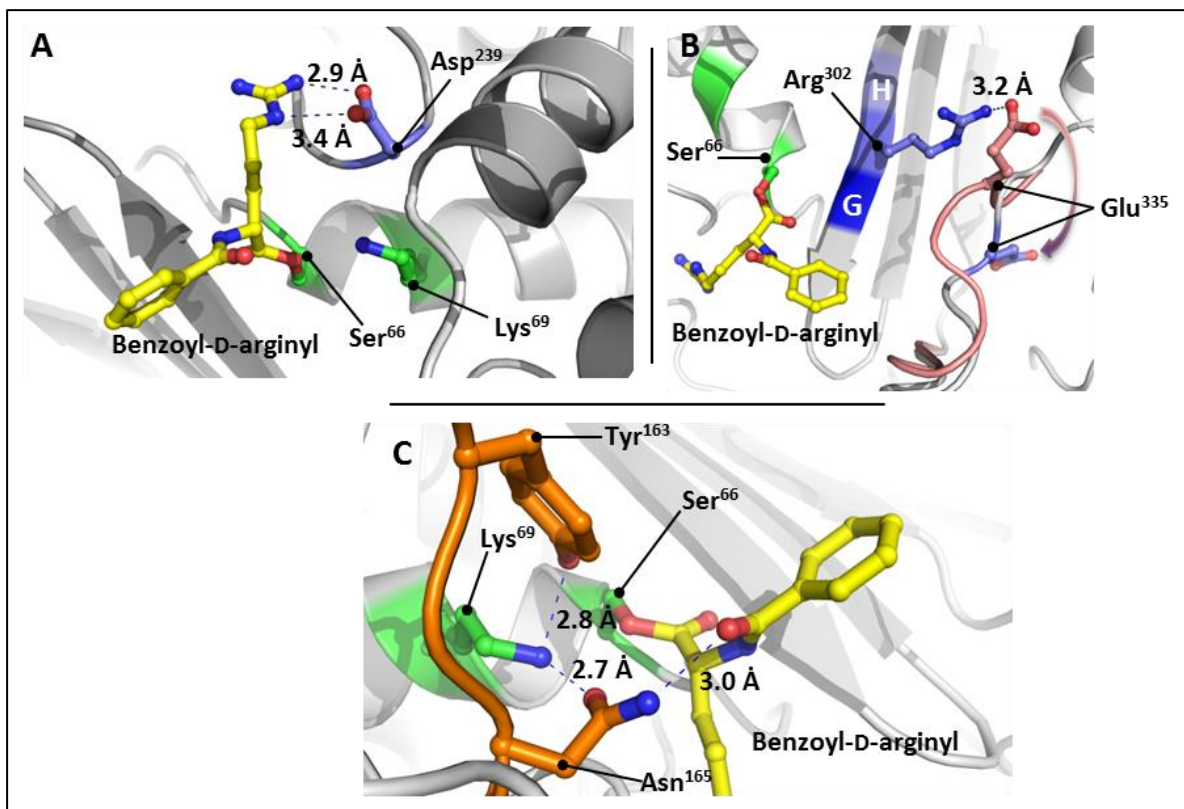
**Abb. 3.6 Darstellung der Kristallstruktur und Übersicht über die Bindungsbereiche der dHy.** Dargestellt ist die Struktur der dHy (A) mit den in PbP konservierten Motiven SXXK und YXN (Grün/Orange in Stabmodell). Zusätzlich wurde das HRG-Motiv (Blau), welches sich in β-Faltblatt 13 befindet sowie die α-Helices 2 und 6 indiziert. Des Weiteren wurde die Oberfläche in Grau, der vermutete Bindungsbereich für Substrate in Blau und das kokristallisierte Phosphat in Grün und Rot als Sphären dargestellt (B). Ergänzend sind die Orientierung des Phosphats im aktiven Zentrum sowie die Abstände zu den katalytisch wichtigen Seitenketten gezeigt (C).

Homologiestudien zu strukturell ähnlichen Proteinen mittels DALI zeigten eine hohe strukturelle Identität der dHy zur Gruppe der dD-Peptidasen auf (Holm & Rosenstrom, 2010). Dabei sind die Vertreter dieser Enzymgruppe durch eine typische  $\beta$ -Lactamase/Transpeptidase-ähnliche Faltung gekennzeichnet, welche sich durch ein Cluster von Helices und ein  $\alpha$ -Helices/ $\beta$ -Faltblatt-Sandwich auszeichnen (**Abb. 3.6**). Diese Einordnung wurde zudem durch Analyse der für diese Gruppe spezifischen und konservierten Motive im aktiven Zentrum bestätigt. So wird das aktive Zentrum durch die am Ende der  $\alpha$ -Helix 2 positioniert katalytische Duade Ser<sup>66</sup> und Lys<sup>69</sup> gebildet (**Abb. 3.6 A**, dargestellt in Grün als Stabmodell). Das Fehlen des K-T/S-G-Motivs und des SXN-Motivs ließen zudem eine Zuordnung in die Untergruppe der LMM-PbP zu. Typisch für diese Enzyme ist überdies das Vorhandensein eines YSN-Motivs, welches sich am N-terminalen Ende der  $\alpha$ -Helix 6 befindet, anstatt des SXN-Motives der *High Molecular Mass*-PbP. Innerhalb dieses Motives befindet sich Asn<sup>165</sup>. Zudem ist das K-T/S-G-Motiv in der dHy durch ein HRG(G)-Motiv ersetzt, welches in  $\beta$ -Faltblatt 13 lokalisiert und vermutlich an der Bildung des Oxanionlochs beteiligt ist (**Abb. 3.6 A**, in blau).

Neben dieser Klassifizierung erlaubte die Liganden-freie Struktur der dHy zudem einen Einblick in die Zugänglichkeit des Substrates und die Koordination der katalytischen Reste im aktiven Zentrum. So wurde in der Kristallstruktur ein Phosphat-Ion im aktiven Zentrum koordiniert (**Abb. 3.6 B-C**, rote und grüne Sphären). Dabei schien die Hauptkoordination von Ser<sup>66</sup> auszugehen, welches 2,8 Å vom Phosphat-Ion entfernt ist. Die gleiche Abstand lag zwischen Lys<sup>69</sup> und Ser<sup>66</sup>, was den Schluss nahe legte, dass das N<sup>ζ</sup> von Lys<sup>69</sup> das O<sup>r</sup> von Ser<sup>66</sup> koordiniert und partiell aktiviert, was wiederum eine Stabilisierung des Phosphat-Ions nach sich zieht. Neben dieser Interaktion scheint es zudem zu einer Wechselwirkung zwischen O<sup>δ</sup> von Asn<sup>165</sup> und N<sup>ζ</sup> von Lys<sup>69</sup> im Abstand von 2,7 Å zu kommen, was die Existenz eines elektrostatischen Netzwerkes innerhalb des aktiven Zentrums und einer erweiterten katalytischen Triade der dHy nahelegt. Die Betrachtung der Oberfläche des Enzyms lässt zudem Schlüsse über die räumliche Beschaffenheit des Substraortes zu (**Abb. 3.6 B**). So lokalisierte das aktive Zentrum mit dem katalytischen Rest Ser<sup>66</sup> am Boden einer relativ tiefen Furche im Enzym, was einen Grund für die Substratlängenlimitierung ab S<sub>2</sub>' vom Enzym darstellen könnte.

Um eine genauere Auflösung der katalytischen Reste im aktiven Zentrum und etwaige koordinativ wirkende Aminosäuren zu identifizieren, wurden *Soaking*-Experimente durchgeführt. Hierbei kamen verschiedene D-Phenylalanin- und D-Arginin-haltige Substrate zum Einsatz. Aufgrund der schlechten Löslichkeit D-Phenylalanin-haltiger Substrate wurde während dieser Experimente 5 % (v/v) DMF verwendet. Dies hatte jedoch zur Folge, dass sich die Kristalle während der *Soaking*-Experimente auflösten bzw. in Kokristallisationsexperimenten keine Kristallisation auftrat. Im Gegensatz dazu war eine Strukturauflösung der dHy zusammen mit dem Substrat Bz-D-Arg-OMe erfolgreich. Dabei konnte

nach einer Inkubationszeit von 30 min mit dem Substrat die Struktur der dHy mit einer Auflösung von 1,66 Å erhalten werden. Eine längere Inkubationszeit mit dem Substrat hingegen führte ebenfalls zur Solvataion des Kristalles bzw. einer verminderten Auflösung. Die Struktur selbst wurde mit einem finalen  $R_{\text{free}}$ -Wert von 0,197 gelöst, wobei die Ligandenfreie Struktur der dHy ohne Lösungsmittel und Ligandenmoleküle als Grundlage für das *Molecular Replacement* genommen wurde. Der RMSD von 0,532 Å für die  $C^{\alpha}$ -Atome in Arg<sup>12</sup> bis Ser<sup>346</sup> Monomer A bzw. 0,538 Å in Monomer B wiesen eine minimale Veränderung zu den RMSD-Werten der Liganden-freien Struktur auf. Dies ließ auf eine Änderung des Proteinrückgrats schließen, wobei die größte Veränderung im Bereich des *Loops* Asn<sup>330</sup> und Ser<sup>336</sup> auftrat. Daneben trat eine erhöhte Elektronendichte am  $O^{\gamma}$ -Atom der Seitenkette von Ser<sup>66</sup> auf. Nach Modellierung von Bz-D-Arginyl wurde deutlich, dass das Enzym eine kovalente Bindung zum Substrat ausgebildet hatte und die Struktur somit ein Intermediat darstellt (**Abb. 3.7 A**).



**Abb. 3.7 Orientierung des Substrates Bz-D-Arg-OME innerhalb des aktiven Zentrums der dHy.** Dargestellt ist die Kristallstruktur des Substrates Bz-D-Arg-OME innerhalb der Bindungstasche der dHy (*Soaking*-Experiment; Gelb, Stabmodell) (**A**). Das Substrat war kovalent an Ser<sup>66</sup> (Grün, Stabmodell) gebunden und wurde durch Asp<sup>239</sup> (Blau, Stabmodell) innerhalb des Bereiches koordiniert. Durch Bindung des Substrates resultierte zudem eine Änderung des  $\beta$ -turn-Bereiches in der Nähe des  $\beta^{15}$ -Faltblattes (**B**). In ungebundenem Zustand des Enzymes (Pink) wurde Glu<sup>335</sup> (Stabmodell) durch Arg<sup>302</sup> koordiniert, welches Teil des HRG-Motives ist (Blau, Arg<sup>302</sup> als Stabmodell). Kam es zur Substratbindung, änderte sich die Koordination des Glu<sup>335</sup> (Blau, Stabmodell; Umklappen indiziert durch Pfeil). Zusätzlich wurden die Koordination der beteiligten Reste Tyr<sup>163</sup>, Lys<sup>69</sup> und Asn<sup>165</sup> (Grün/Orange, Stabmodell) während der Bindung sowie deren Abstände zueinander bzw. zum Substrat hervorgehoben (**C**).

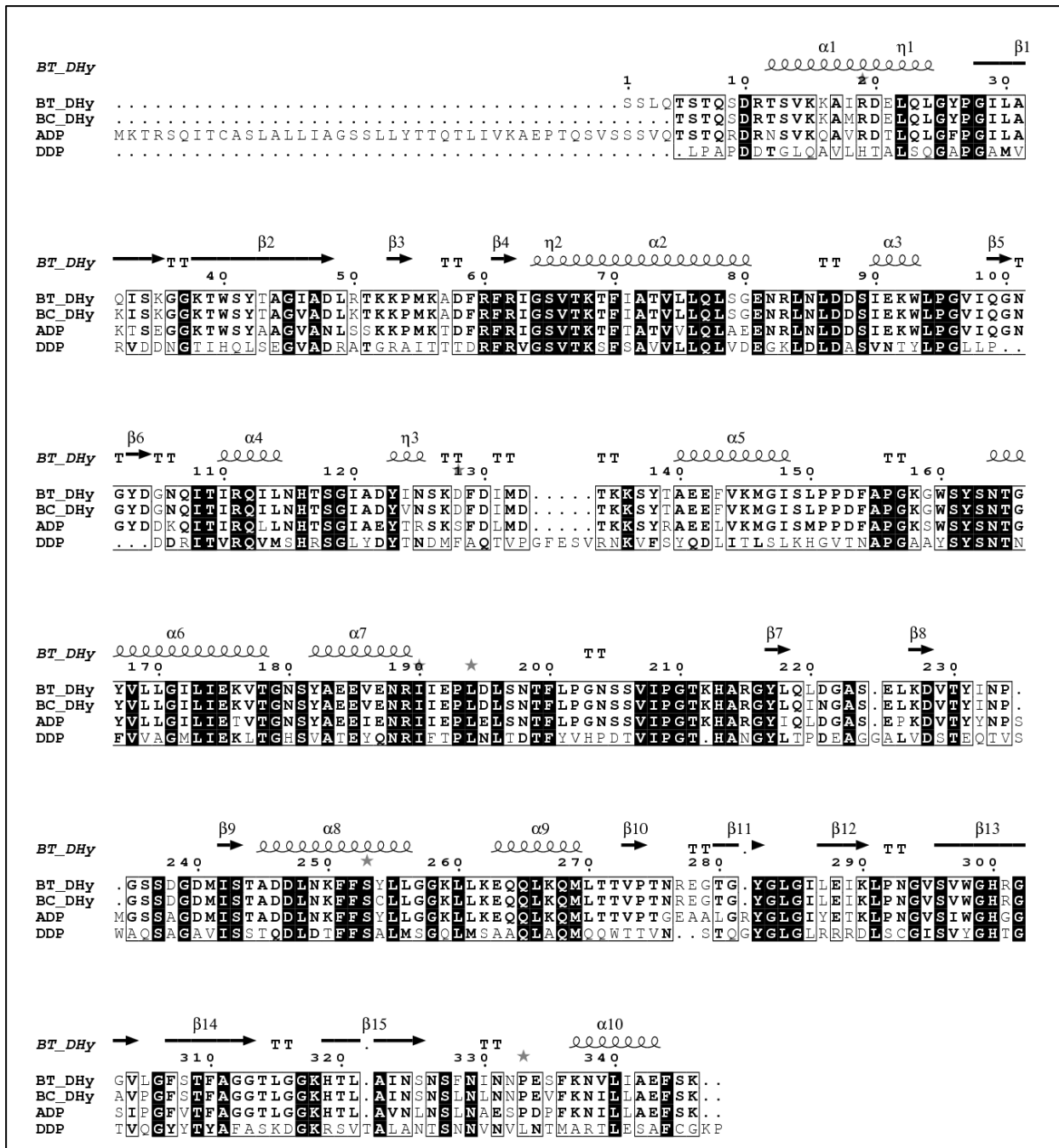
Daneben wurde das Substrat durch eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen  $O^{\delta 2}$  und  $O^{\delta 1}$  des Asp<sup>239</sup> sowie  $N^{\eta}$  und  $N^{\epsilon}$  des Bz-D-Arginyl koordiniert. Im Fall von Serinproteasen sind bei einer solchen Koordinierung drei mögliche Zustände (tetrahedrales oder reaktives Intermediat, Enzym-Inhibitor-Komplex) denkbar. Daher wurden die Winkel, welche an der Bindung und Orientierung des Substrates beteiligt waren, bestimmt. Ausgehend von den Winkeln  $\phi$  -68°,  $\psi$  -6°,  $X_{\text{cat}}$  -95° und  $\alpha_{\text{cat}}$  141° wurde deutlich, dass die Struktur ein reaktives Intermediat darstellt (Buller & Townsend, 2013). Neben der Koordination des Substrates gab die Struktur zudem Aufschluss über weitere Veränderungen während der Bindung des Substrates Bz-D-Arg-OMe. So änderte der in der Ligand-freien Struktur dem HRG-Motiv zugewandte *Loop*<sup>335</sup> seine Orientierung im Molekül (**Abb. 3.7 B**). Damit wurde die elektrostatische Bindung des Substrates, welche die Salzbrücke zwischen Arg<sup>302</sup> und Glu<sup>332</sup> bewirkte, nicht mehr ausgebildet. Dies wiederum scheint eine Öffnung des Substratbindungsortes zu bewirken, was eine Erklärung für den verringerten Acyltransfer bzw. die verringerte Zugänglichkeit langkettiger Nucleophile liefern könnte. Innerhalb des YSN-Motivs schien sich die stabilisierende, koordinative Funktion von Asn<sup>165</sup> zu bestätigen. So trat wie auch schon in der Liganden-freien Struktur erneut eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen  $O^{\delta}$  von Asn<sup>165</sup> und  $N^{\zeta}$  von Lys<sup>69</sup> auf (**Abb. 3.7 C**). Dass diese Wechselwirkung zielgerichtet erfolgt, wurde abermals durch die stabilisierende elektrostatische Wechselwirkung von  $O^{\delta}$  von Asp<sup>123</sup> hinzu  $N^{\delta}$  von Asn<sup>151</sup> deutlich. Zusätzlich bildete Asn<sup>165</sup> eine weitere elektrostatische Wechselwirkung über 3,0 Å hin zum  $O^{2-\alpha}$  der Benzoesäure aus. Die Funktion des Tyr<sup>163</sup> hingegen wurde aus der Struktur nicht direkt deutlich, jedoch ist es aufgrund des Abstandes von 2,8 Å zu Lys<sup>69</sup> denkbar, dass es innerhalb der Reaktion der dHy die Funktion einer allgemeinen Base übernimmt.

### 3.1.6 Charakterisierung der Substratspezifität dHy aus *B. cereus*

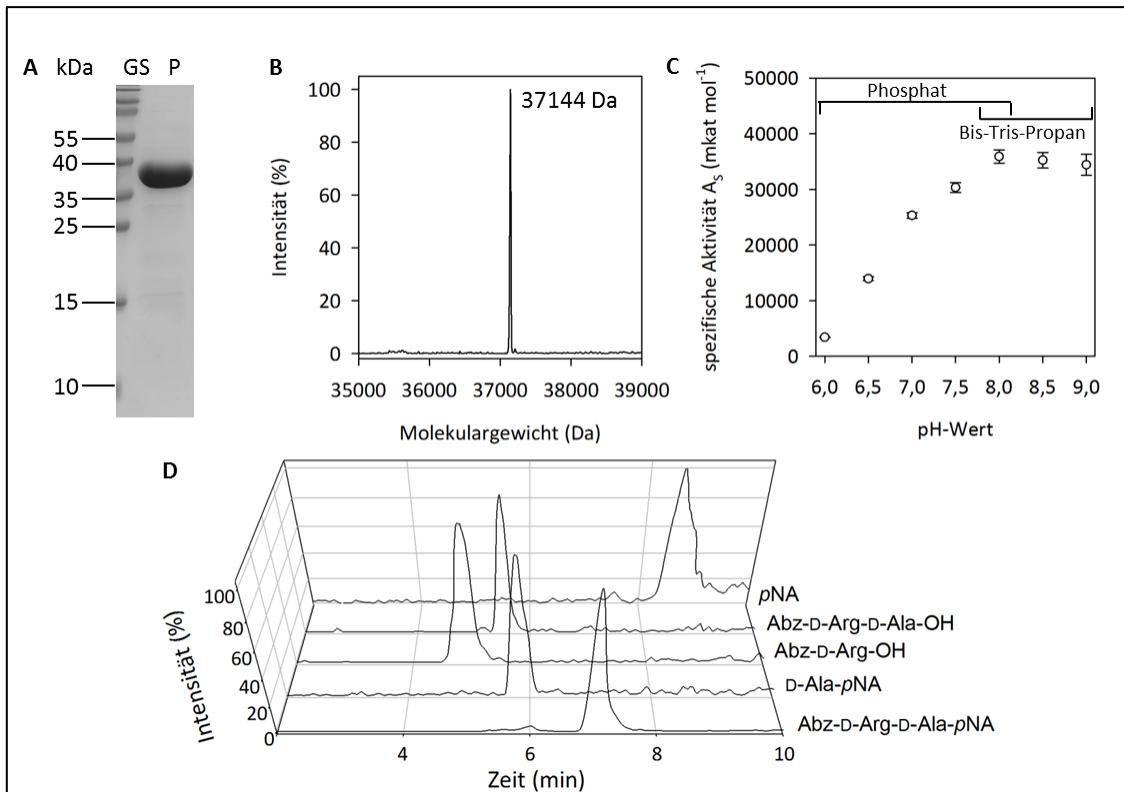
Mit Hilfe der bioinformatischen Studien war es möglich, Organismen, welche potentielle ADP-ähnliche Proteasen synthetisieren, zu identifizieren und mit Hilfe des IQFS in selbigen diese proteolytische Aktivität nachzuweisen und zuzuordnen. Die so identifizierte dHy zeigte eine hohe Sequenzähnlichkeit (88 %) und Sequenzidentität (81 %) zur Matrize ADP (**Abb. 3.8**) (Altschul *et al.*, 1990). Ausgehend von diesem Ergebnis wurde die dHy aus *B. thuringiensis* als Matrize für eine bioinformatische Studie in *B. cereus* genutzt. Als Ergebnis hiervon konnte eine dHy-ähnliches dHy mit höherer Sequenzähnlichkeit (98 %) und Identität (96 %) zur dHy identifiziert werden, wobei zu bemerken ist, dass der Großteil der Sequenzunterschiede im Bereich der Substratbindungsstelle  $S_1$  und  $S_1'$  lokalisiert sind (**Abb. 3.8**). Daher wurde die D-stereospezifische Hydrolase (UniProt ID: Q81BN3) aus *B. cereus* DSM 31 kloniert und biosynthetisiert und mittels der Reinigungsstrategie, welche bereits für die dHy aus *B. thuringiensis* etabliert wurde, gereinigt. Die Ausbeute an erhaltenem Protein betrug 18 mg l<sup>-1</sup>. Durch gelelektrophoretische und LC/MS-spektrometrische Analyse wurde die Reinheit des

Proteins überprüft, wobei der *N*-Terminus des Proteins aufgrund eines alternativen Startcodons um 4 Aminosäuren verkürzt wurde (**Abb. 3.8** sowie **3.9 A** und **B**). Dementsprechend betrug die bestimmte Molekulare Masse des verkürzten Proteins 37.144 Da ( $MW_{\text{ber.}}$ : 37.139 Da). Zudem wurde das pH-Optimum ermittelt, welches mit einer spezifische Aktivität von  $35,9 \text{ kat mol}^{-1}$  bei pH 8,0 lag, wohingegen das Optimum von pH 7,5 bis pH 9,0 erstreckte (**Abb. 3.9 C**). Weiterhin wurde die Akzeptanz des IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-*p*NA mittels Fluoreszenzmessung ( $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm) bei einer spezifischen Aktivität von  $2,43 \text{ kat mol}^{-1}$  bestimmt. Anders als bei der dHy aus *B. thuringiensis* kam es jedoch nicht ausschließlich zur Spaltung nach D-Arginin. Vielmehr ließen sich mittels LC-MS neben dem IQFS (RT: 7,01 min,  $m_{\text{ber}}$  483,  $m/z_{\text{best}}$  485) die vier Produkte Abz-D-Arg-OH (RT: 4,91 min,  $m_{\text{ber}}$  293,  $m/z_{\text{best}}$  294), D-Ala-*p*NA (RT: 5,76 min,  $m_{\text{ber}}$  209,  $m/z_{\text{best}}$  210), Abz-D-Arg-D-Ala-OH (RT: 5,51 min,  $m_{\text{ber}}$  364,  $m/z_{\text{best}}$  365) und *p*NA (RT: 8,56 min,  $m_{\text{ber}}$  138,  $m/z_{\text{best}}$  139) detektieren (**Abb. 3.9 D (HPLC)**/ MS-Daten sind nicht gezeigt, da diese identisch mit jenen der dHy aus *B. thuringiensis* sind (vgl. **Abb. 3.3**).

Die  $S_1$ -Bindungsortspezifität wurde wiederum mit Hilfe der Bz-D/L-Xaa-OMe-Bibliothek untersucht. Dabei folgte die Auswahl der Aminosäuren den gleichen Kriterien, wie sie schon zur Untersuchung der ADP angewendet wurden (**Kap. 3.1.1**). Bei der Analyse der spezifischen Aktivitäten des  $S_1$ -Substratbindungsortes der dHy aus *B. cereus* wurde deutlich, dass die Aminosäuren ein ähnliches Aktivitätsprofil wie bei der dHy aus *B. thuringiensis* aufweisen (**Tab. 3.6 / Tab. 3.4**). So zeigte das Enzym die höchsten spezifischen Aktivitäten gegenüber den aromatischen D-Aminosäuren D-Phenylalanin ( $89,6 \text{ kat mol}^{-1}$ ), D-Tryptophan ( $45,3 \text{ kat mol}^{-1}$ ) und D-Tyrosin ( $23,4 \text{ kat mol}^{-1}$ ) sowie der basischen Aminosäure D-Arginin ( $35,9 \text{ kat mol}^{-1}$ ). Ebenso war wiederum eine deutliche Diskriminierung der L-Aminosäuremethylester um eine Größenordnung von etwa  $10^5$  zu beobachten. Ergänzend hierzu wurden abschließend die kinetischen Konstanten der Hydrolyse von Bz-D-Arg-OMe bestimmt. So wurde ein im Vergleich zur dHy aus *B. thuringiensis* niedrigerer  $K_M$ -Wert ( $32,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ) und  $k_{\text{cat}}$  ( $36,1 \pm 1,7 \text{ s}^{-1}$ ) bestimmt.



**Abb. 3.8 Alignment der in dieser Arbeit verwendeten DD-Peptidasen.** Dargestellt ist das Alignment der Sequenzen der dHy aus *B. thuringiensis* (BT\_DHy, UniProt-ID: C3FM16), der dHy aus *B. cereus* (BC\_DHy, UniProt-ID: Q81BN3), der alkalischen D-Peptidase aus *B. cereus* (ADP, UniProt-ID: P94288) und der in der Kristallisation als Template genutzten DD-Peptidase aus *Streptomyces* R61 (DDP). Im Alignment wurden konservierte Aminosäuren schwarz unterlegt, Aminosäuren mit ähnlicher Funktion dick geschrieben und konservierte Regionen umrahmt. Die Nummerierung orientiert sich an der gewählten Nummerierung der dHy aus *B. thuringiensis*. Zusätzlich sind Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$  –  $\alpha$ -Helix,  $\eta$  –  $3_{10}$ -Helix,  $\beta$  –  $\beta$ -Faltblatt, TT –  $\beta$ -Turn) entsprechend der *B. thuringiensis*-dHy-Struktur gekennzeichnet. Das Alignment wurde mittels MultAlign und die Darstellung mittels ESPript3 durchgeführt (Corpet, 1988; Robert & Gouet, 2014).



**Abb. 3.9** Initiale Charakterisierung der dHy aus *B. cereus*. Nach Biosynthese und Reinigung wurde das Protein gelelektrophoretisch (A), massenspektrometrisch (B) und hinsichtlich der pH-Abhängigkeit analysiert (C). Zudem ist die LC-MS-Analyse des IQFS-Umsatzes bei einzelnen m/z gegen die Zeit gezeigt (D) / Reaktionsbedingungen: 0,1 M Na-Phosphat (pH 6,0 – 8,0), 0,1 M BTP (pH 8,0 – 9,0), 1 % (v/v) DMF, 20 nM dHy, 2 mM Bz-Arg-OM, 2 mM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 30 °C / Elektropherogramm: 12,5 % (w/v) Polyacrylamid SDS-PAGE, Coomassie-Blau-Färbung, PageRuler Prestained Ladder (GS), konzentrierte Fraktionen (P) / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC/LC-MS (Gradient: 0 auf 40/100 % ACN, 3/20 Min.,  $\lambda$  254 nm) / Detektierte m/z: IQFS (485), D-Ala-pNA (210), Abz-D-Arg-OH (294), Abz-D-Arg-D-Ala-OH (365), pNA (139).

Die Analyse des  $S_1'$ -Substratbindungsortes wies eine höhere Stereoselektivität der dHy aus *B. cereus* im Vergleich zur dHy aus *B. thuringiensis* auf. So wurden unter den gewählten Bedingungen mit Bz-D-Arg-OMe als Acyldonor keine L-Aminosäureamide als Nukleophil akzeptiert, während D-Phe-NH<sub>2</sub> (39 M<sup>-1</sup>) und D-Met-NH<sub>2</sub> (14,5 M<sup>-1</sup>) am besten akzeptiert wurden. In Analogie zu den vorangegangenen Studien wurden ebenfalls Acyltransferreaktionen mit Pentapeptid-Nukleophilen durchgeführt. Jedoch konnte auch hier im Gegensatz zur Aminosäurenamidenukleophilen kein Produktbildung detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



Tab. 3.6 Bestimmung der  $S_1$ - und  $S_1'$ -Substratbindungsortsspezifitäten der dHy aus *B. cereus*.<sup>3</sup>

spezifische Aktivität $A_s$ [mkat mol <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>		Aminosäure (Xaa)	reziproker Partitionswert $p^{-1}$ [M <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	
Bz-D-Xaa-OMe	Bz-L-Xaa-OMe		D-Xaa-NH <sub>2</sub>	L-Xaa-NH <sub>2</sub>
89.600	3,21	<b>Phe</b>	39,06	1,32
45.300	1,35	<b>Trp<sup>c</sup></b>	n. b. <sup>d</sup>	n. b.
35.900	0,70	<b>Arg</b>	1,58	0,81
23.400	4,38	<b>Tyr</b>	n. b.	n. b.
15.800	0,52	<b>His</b>	n. b.	n. b.
12.000	1,21	<b>Met</b>	14,5	0,36
505	n. d. <sup>e</sup>	<b>Ala</b>	1,24	0,93
n. b.	n. b.	<b>Leu</b>	2,14	n. d.
606	n. d.	<b>Ser</b>	n. d.	n. d.
178	n. d.	<b>Val</b>	n. b.	n. b.
26	n. d.	<b>Glu</b>	n. d.	n. d.
n. d.	n. d.	<b>Pro</b>	n. d.	n. d.

Reaktionsbedingungen: 100 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,01 – 5 µM dHy, <sup>a</sup> 2 mM Bz-D/L-Xaa-OMe, <sup>b</sup> 2 mM Bz-D-Arg-OMe, 20 mM D/L-Xaa-NH<sub>2</sub> / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC (variable Gradienten,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug <sup>a</sup>< 5 % bzw. <sup>b</sup>10 %. /<sup>c</sup> 5 % (v/v) DMF wurden verwendet /<sup>d</sup>n. b. – Das Substrat wurde nicht berücksichtigt. /<sup>e</sup> n. d. - Ein Umsatz konnte nicht detektiert werden.

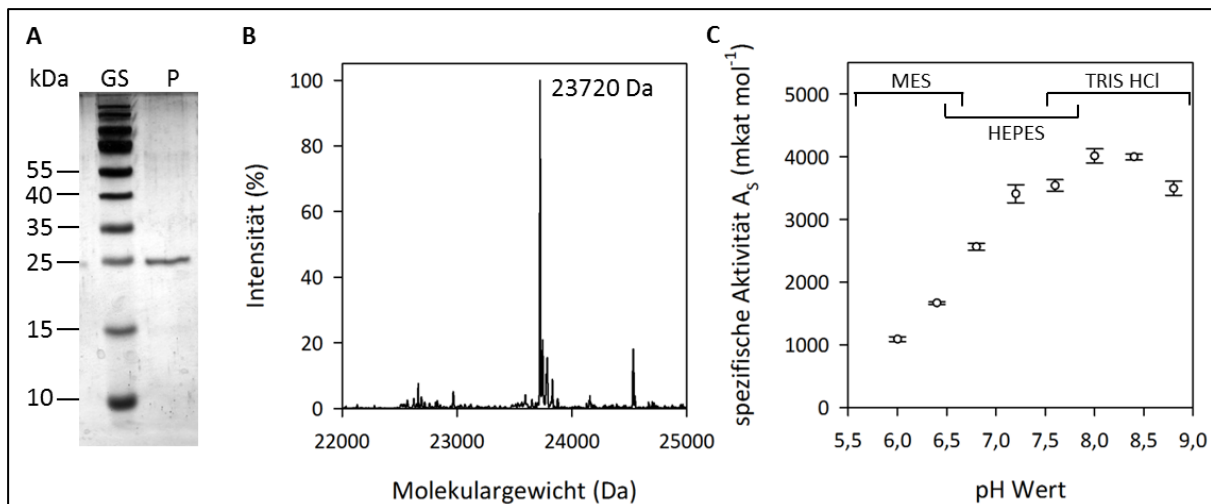
## 3.2 Evolution der Stereoselektivität von Trypsin

Nach der erfolgreichen Anwendung des Screeningssubstrates Abz-D-Arg-D-Ala-pNA zur Detektion und Isolation nativer, bislang unbekannter D-stereospezifischer Proteasen rückte die Entwicklung eines Screeningansatzes zur Inversion der Stereospezifität L-stereospezifischer Proteasen in den Fokus dieser Arbeit. Dabei waren die Hauptziele die Identifizierung und Charakterisierung einer geeigneten Trypsingerüstvariante, die Entwicklung und Etablierung eines Screening- und zur Generierung zu D-stereospezifischen Trypsinvarianten sowie deren Charakterisierung.

### 3.2.1 Charakterisierung von SSAI-Trypsin

Für die Veränderung der Stereospezifität L-Aminosäurespezifischer Proteasen hin zu einer D-Aminosäure-Spezifität wurde SSAI-Trypsin als Gerüstvariante gewählt. Diese aus dem Faktor Xa abgeleitete Trypsinvariante versprach im Vorfeld dieser Arbeit eine erhöhte Plastizität, sowie eine verminderte Stringenz im  $S_1$ -Substratbindungsort (Rauh *et al.*, 2004).

<sup>3</sup> Teile der Ergebnisse der hier dargestellten Daten erfolgten im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von Philip Lössl.



**Abb. 3.10 Analytik und initiale Charakterisierung von SSAI-Trypsin.** Das Gen wurde wie beschrieben kloniert und in *S. cerevisiae* synthetisiert (Kap. 2.4.3). Nach Reinigung, Aktivierung, Vereinigung und Konzentration der proteinhaltigen Fraktionen wurde die Probe sowohl gelelektrophoretisch (A) als auch massenspektrometrisch analysiert (B). Des Weiteren wurde die Abhängigkeit des Proteins vom pH-Wert untersucht und ein Optimum zwischen 7,5 und 8,8 bestimmt (C). Reaktionsbedingungen: 100 mM MES (pH 6,0 – 7,0), 100 mM HEPES (pH 6,5 – 8,5), 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5 – 9,0), 10 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) DMF, 0,1 μM SSAI-Trypsin, 2 mM Bz-Arg-OMe, 30 °C / Elektropherogramm: 12,5% (w/v Acrylamid) SDS-PAGE, Coomassie-Blau-Färbung, PageRuler Prestained Ladder (GS), konzentrierte Fraktionen (P) / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC/LC-MS (Gradient: 0 auf 40/100% ACN, 3/20 min, λ 254 nm)

Nach Klonierung und Mutagenese wurde das für die zymogene Form von SSAI-Trypsin kodierende Gen heterolog in *S. cerevisiae* entsprechend der im Arbeitskreis etablierten Protokolle exprimiert. Anschließend erfolgte die auch Reinigung nach diesen Protokollen mittels Kationenaustauschchromatografie, eine 1 – 2 stündige Aktivierung mittels Entero-kinase und abschließend eine Anionenaustauschchromatografie, so dass letztlich SSAI-Trypsin mit einer Ausbeute von 5 bis 7,5 mg/l<sub>Kultur</sub> hergestellt werden konnte. Durch gelelektrophoretische Analyse konnte die Reinheit des Proteins bestätigt werden. Hierbei zeigte SSAI-Trypsin ein zum Wildtyp-Trypsin verändertes Migrationsverhalten im reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gel und migrierte bei etwa 25 kDa (Abb. 3.10 A). Die Identität zudem mittels LC-MS ( $m_{\text{ber}}$  23710 Da,  $m_{\text{best}}$  23720 Da) überprüft und bestätigt (Abb. 3.10 B). Um das Enzym kinetisch charakterisieren zu können, wurde zunächst die pH-Abhängigkeit für SSAI-Trypsin bestimmt (Abb. 3.10 C). Die Enzymaktivität gegenüber dem Substrat Bz-Arg-OMe wies dabei mit 4,1 kat mol<sup>-1</sup> ein Optimum bei einem pH-Wert von 8,0 sowie einen breiten optimalen pH-Bereich von 7,0 bis 9,5 auf. Die folgende enzymkinetische Charakterisierung inklusive die Bestimmung der Substratbindungsspezifitäten wurde aus Stabilitätsgründen des Esters jedoch bei einem pH-Wert von 7,8 durchgeführt, wobei dies mit einem Absinken der spezifischen Aktivität auf 86,5% im Vergleich zur Aktivität bei einem pH-Wert von 8,0 einhergeht.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten von SSAI-Trypsin wurden die Aminosäure-Analoga Bz-Arg-OMe, Ac-Arg-pNA und Bz-Arg-AMC sowie das Peptidsubstrat Bz-AARAAG-OH

verwendet. Dabei wurden die Substrate so gewählt, dass sie ein möglichst breites Spektrum chemisch unterschiedlicher zu spaltenden Bindungen reflektieren. Um zudem eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die kinetischen Konstanten ebenfalls für Wildtyp(wt)-Trypsin bestimmt. Die berechneten Spezifitätskonstanten beider Enzyme zeigten, dass diese im Fall von SSAI-Trypsin um bis zu 650-fach minimiert ist als bei wt-Trypsin. Ursächlich hierfür waren sowohl die erhöhten  $K_M$ -Werte als auch die erniedrigten  $k_{cat}$ -Werte von SSAI-Trypsin (**Tab. 3.7**).

Im Vergleich dazu waren beim Estersubstrat Bz-Arg-OMe war  $K_M$ -Wert beider Enzyme für das Substrat nahezu identisch, während der  $k_{cat}$ -Wert eine achtfache Absenkung auf  $0,36 \text{ s}^{-1}$  bei SSAI-Trypsin im Vergleich zu Wt-Trypsin aufwies. Diese Absenkung des  $k_{cat}$ -Wertes war ebenfalls bei den Substraten Ac-Arg-pNA und Bz-Arg-AMC zu beobachten. Zudem wurde bei diesen Substraten auch der  $K_M$ -Wert beeinflusst. Dieser stieg bei SSAI-Trypsin im Vergleich zum wt-Trypsin im Fall des pNA-Substrates um das 26-fache und im Fall des AMC-Substrates um das 11-fache. Die Analyse des Peptidsubstrates hingegen wies keine so deutliche Veränderung der kinetischen Parameter auf. So sind beide Parameter in SSAI-Trypsin in Bezug auf wt-Trypsin nur schwach verringert (6-fach  $K_M$ , 4-fach  $k_{cat}$ ).

**Tab. 3.7 Übersicht über die kinetischen Parameter von Wildtyp-Trypsin und SSAI-Trypsin.<sup>4</sup>**

Wildtyp-Trypsin <sup>a</sup>			Substrat	SSAI-Trypsin		
$k_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_M \text{ (}\mu\text{M)}$	$k_{cat}/K_M \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$		$k_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_M \text{ (}\mu\text{M)}$	$k_{cat}/K_M \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$
2,87	45,3	63.300	<b>Bz-Arg-OMe</b>	0,36	58,8	6.160,0
0,38	82,1	4.670	<b>Ac-Arg-pNA</b>	0,02	2170	7,3
0,16	72,6	2.220	<b>Bz-Arg-AMC</b>	0,03	820	32,4
4,66	750,0	6.210	<b>Bz-AARAAG</b>	1,19	4680	254,0

<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: 100 mM HEPES (pH 7,8), 100 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,05 – 10 mM Substrat, 50 – 350 nM Wildtyp-Trypsin bzw. 0,1 – 5,5  $\mu\text{M}$  SSAI-Trypsin / Die Analyse der Reaktionen erfolgten mittels UPLC (Gradient: 5 auf 40 % ACN, 3 min,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug < 5 %.

Die Bestimmung der  $S_1$ -Bindungsortspezifität erfolgte erneut mit Hilfe der Bz-D/L-Xaa-OMe-Bibliothek. Dabei erfolgte die Auswahl der verwendeten Aminosäuren analog den Kriterien der  $S_1$ -Spezifitätsbestimmung der ADP (**Kap. 3.1.1**). Die Analyse der  $S_1$ -Bindungsortspezifität zeigte deutlich, dass SSAI-Trypsin im Unterschied zu den zuvor untersuchten Enzymen ADP und dHy eine klare Stereoselektivität gegenüber den untersuchten Estern aufwies (**Tab. 3.8**). So wurden ausschließlich L-Aminosäuren vom Enzym als Substrate akzeptiert. Dabei war die Hauptaktivität klar gegenüber Arginin mit seiner basischen Seitenkette ( $3,5 \text{ kat mol}^{-1}$ ) festzustellen. Neben dieser Aktivität konnte eine Hydrolyse weiterer Bz-L-Xaa-OMe detektiert werden. Dabei wurden sowohl Bz-Xaa-OMe kleinerer aliphatischer Aminosäuren wie Alanin

<sup>4</sup> Die Ergebnisse der hier dargestellten Daten wurden im Rahmen der betreuten Masterarbeit von G. Höger und der Bachelorarbeit von F. Armbrust generiert.

(112 mkat mol<sup>-1</sup>), als auch größerer Aminosäuren wie Methionin (61 mkat mol<sup>-1</sup>), Tryptophan (44 mkat mol<sup>-1</sup>) und polarer Aminosäuren wie His (50 mkat mol<sup>-1</sup>) als Substrat umgesetzt. Dahingegen diskriminierte SSAI-Trypsin größere aliphatischen Aminosäuren wie Leucin und Isoleucinswoei den Aminosäuren wie Glutamat und Glutamin. Eine Hydrolyse gegenüber Bz-D-Xaa-OMe aus der Substratbibliothek konnte nicht detektiert werden.

Aufgrund der reduzierten proteolytischen Aktivität von SSAI-Trypsin gegenüber dem Peptid Bz-AARAAG-OH stellt es einen potentiellen Biokatalysator für die zukünftige Anwendung zu Knüpfung von Peptid-bindungen im Konzept der Substratmimetikaassistierten Peptid-synthese dar. Um das Potential für eine solche Nutzung zu evaluieren und um die S'-Substratbindungsortspezifität zu bestimmen, wurden Modellacyltransferreaktionen durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Hydrolyse von Substratmimetika des Typs Bz-Gly-X (X: -OGp, -SPh, -OBzl, -Phe, -OPic)<sup>5</sup> mittels HPLC untersucht. Dabei ergab sich die höchste spezifische Aktivität (7,2 mkat mol<sup>-1</sup>) für Bz-Gly-OGp-Ester, während andere Abgangsgruppen wie Thiophenyl- (-SPh/ 3,6 mkat mol<sup>-1</sup>), Benzoyl- (-OBzl / 0,93 mkat mol<sup>-1</sup>), Phenyl- (-OPh / 0,69 mkat mol<sup>-1</sup>) und Picolyester (-OPic / 0,65 mkat mol<sup>-1</sup>) deutlich langsamere Umsatzgeschwindigkeiten aufwiesen. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde in der Folge die Akzeptanz diverser OGp-tragender Mimetika des Typs Bz-Xaa-OGp untersucht.

**Tab. 3.8 Übersicht über Charakterisierung der S<sub>1</sub>-Bindungsortspezifitäten von SSAI-Trypsin.**<sup>6</sup>

Aminosäure (Xaa)	spezifische Aktivität A <sub>s</sub> (mkat mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	
	Bz-Xaa-OMe	Bz-Xaa-OGp
Arg	3.550,0	n. b. <sup>b</sup>
Phe	18,7	27,3
His	50,3	n. b.
Tyr	25,9	2,5
Trp	44,0	n. b.
Ala	112,1	21,1
Leu	n. d. <sup>c</sup>	25,5
Ile	n. b.	0,74
Val	4,7	n. b.
Ser	n. d.	13,0
Met	61,2	20,6
Glu	n. d.	7,3
Gln	n. d.	9,5
Gly	18,9	7,2
Pro	3,2	n. d.

<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: 100 mM HEPES (pH 7,8), 100 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 2 mM Bz-AS-OMe bzw. Bz-AS-OGp, 5 – 50 µM SSAI-Trypsin / Die Analyse der Reaktionen erfolgten mittels UPLC/HPLC (variable Gradienten, 3/15 min, λ 254 nm). Die Messabweichung betrug < 5 %. /<sup>b</sup> n. b. – Der Ester wurde nicht berücksichtigt. /<sup>c</sup> n. d. – Ein Umsatz konnte nicht detektiert werden.

<sup>5</sup> 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 2 mM Ester, 50 µM Enzym

<sup>6</sup> Teile der Ergebnisse der hier dargestellten Daten wurden im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von F. Armbrust generiert.

Die Auswahl erfolgte erneut nach den Kriterien, die bereits der Auswahl der Ester zugrunde lagen (**Kap. 3.1.1**). Auf den Einsatz von Bz-Arg-OGp wurde verzichtet, da selbiger chemisch nur wenig stabil ist und im wässrigen Milieu einer Spontanhydrolyse unterliegt. Im Vergleich der Hydrolysen von Bz-Xaa-OGp mit jenen der Bz-Xaa-OMe zeigte sich eine Verringerung der Hydrolyseaktivitäten (**Tab. 3.8**). So wurden die Ester Bz-Phe/Ala/Leu/Ser-OGp mit einer spezifischen Aktivität von 20 – 27 mkat mol<sup>-1</sup> hydrolysiert, was einer 140-fach langsameren hydrolytischen Aktivität als jener des Bz-Arg-OMe entspricht. Ausgehend von diesem Ergebnis wurden in der Folge Modellacyltransferreaktionen mit Aminosäureamiden sowie Pentapeptiden durchgeführt. Die Auswahl der Aminosäureamide erfolgte wiederum nach den Kriterien, die der Auswahl der Bz-Xaa-OMe zu Grunde gelegt wurde. Die Auswahl der Peptide hingegen erfolgte nach der Akzeptanz der untersuchten Aminosäureamide. Als Acyldonoren wurden das Estersubstrat Bz-Arg-OMe, der Guanidinophenylester Bz-Phe-OGp und der achirale Guanidinophenylester Bz-Gly-OGp ausgewählt.

**Tab. 3.9 Bestimmung der S<sub>1</sub>'-Substratbindungsortspezifität von SSAI-Trypsin.**<sup>7</sup>

Acylakzeptor	reziproker Partitionswert p <sup>-1</sup> (M <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		
	Bz-Phe-OGp	Bz-Gly-OGp	Bz-Arg-OMe
Met-NH <sub>2</sub>	1400	1540	47,4
Phe-NH <sub>2</sub>	835	127	28,2
Leu-NH <sub>2</sub>	504	193	16,5
Ala-NH <sub>2</sub>	31,0	415	3,21
Asn-NH <sub>2</sub>	42,4	18,6	7,33
Ser-NH <sub>2</sub>	25,2	112	6,64
Lys-NH <sub>2</sub>	36,4	83,1	3,28
Glu-NH <sub>2</sub>	3,48	102,2	3,47
Gly-NH <sub>2</sub>	5,22	35,4	<1,0 <sup>b</sup>
Pro-NH <sub>2</sub>	n. d. <sup>c</sup>	n. d.	n. d.
MAAAG	1380	1300	381
FAAAG	131	117	72
LAAAG	209	255	64
AAAAG	n. d.	185	n. d.

<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: 100 mM HEPES (pH 8,0), 100 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 7 % (v/v) DMSO (im Fall von Peptiden), 2 mM Acyldonor, 27 μM SSAI-Trypsin, 20 mM Peptide/AS-NH<sub>2</sub>, / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels HPLC (variable Gradienten, 15 min, λ 254 nm). Die Messabweichung beträgt < 10 %. /<sup>b</sup> Produktbildung konnte nur durch massenspektrometrische Analyse nachgewiesen werden. /<sup>c</sup> n. d. – Ein Umsatz konnte nicht detektiert werden.

<sup>7</sup> Teile der Ergebnisse der hier dargestellten Daten wurden im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von F. Armbrust generiert.

Die Auswertung der Acyltransferreaktionen wies eine deutliche Erhöhung und damit Verbesserung der  $p^{-1}$ -Werte bei Verwendung der Substratmimetika in den Reaktionen gegenüber dem verwendeten Bz-Arg-OMe auf (**Tab. 3.9**). So stieg im Fall von Met-NH<sub>2</sub>, dem am besten akzeptierten Nukleophil, der  $p^{-1}$ -Wert um das 30-fache an (Bz-Arg-OMe: 47,4 M<sup>-1</sup> / Bz-Phe/Gly-OGp: 1400/1540 M<sup>-1</sup>). Eine Erhöhung der  $p^{-1}$ -Werte war ebenfalls bei den übrigen verwendeten Nukleophilen zu beobachten. Darüber hinaus wurde bei den untersuchten Modelreaktionen, welche Pro-NH<sub>2</sub> als Nukleophil verwenden, keine Produktbildung detektiert.

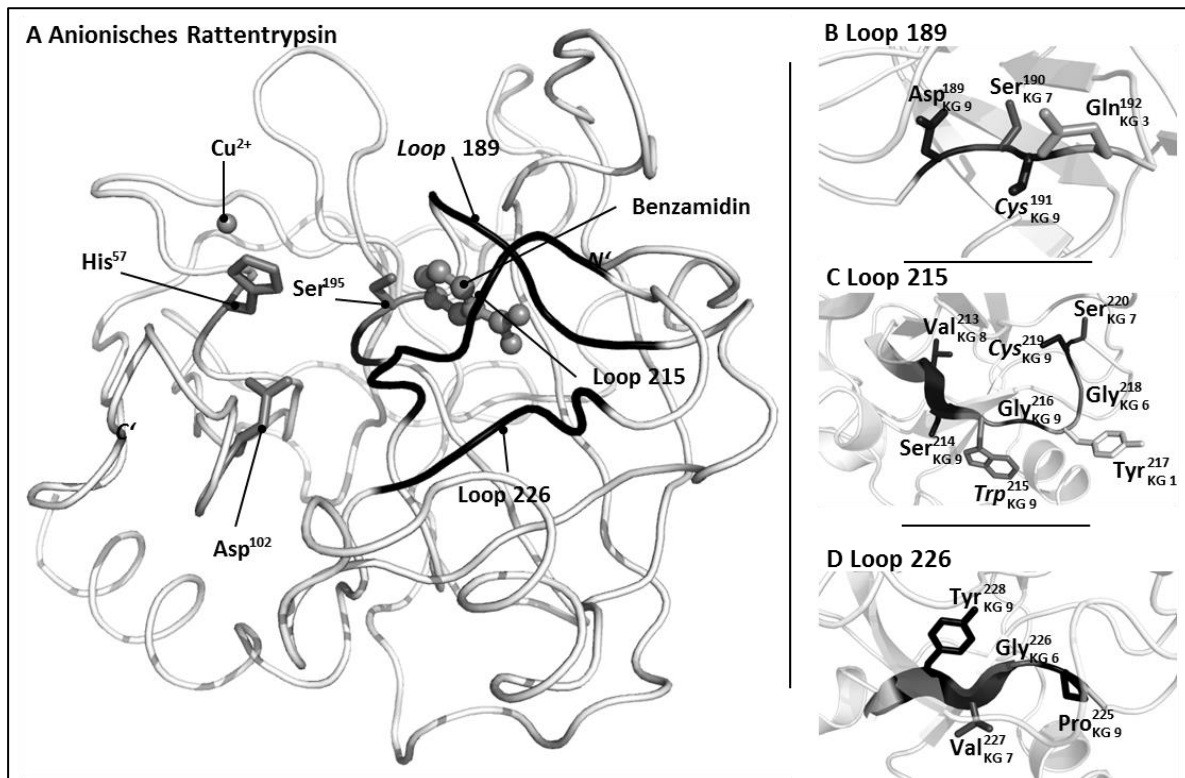
Bei Acyltransferreaktionen mit Bz-Phe-OGp als Acyldonor wurden die höchsten  $p^{-1}$ -Werte für Met-NH<sub>2</sub> (1400 M<sup>-1</sup>), für Phe-NH<sub>2</sub> (835 M<sup>-1</sup>) und Leu-NH<sub>2</sub> (504 M<sup>-1</sup>) erreicht. Im Fall von von Bz-Gly-OGp als Acyldonor wurde für Met-NH<sub>2</sub> ein  $p^{-1}$ -Wert von 1540 M<sup>-1</sup> gemessen. Die Aminosäureamide Ala-NH<sub>2</sub> (415 M<sup>-1</sup>), Phe-NH<sub>2</sub> (127 M<sup>-1</sup>) und Leu-NH<sub>2</sub> (193 M<sup>-1</sup>) werden ebenfalls als Nukleophil akzeptiert.

Ausgehend von der Akzeptanz der Aminosäureamide wurde in der Folge die Akzeptanz längerer Nukleophile in Form von Pentapeptiden in Acyltransferreaktionen untersucht (**Tab. 3.9**). Hierbei zeigte sich für den Acylakzeptor MAAAG im Fall von Bz-Arg-OMe als Acyldonor eine 8-fache Steigerung des  $p^{-1}$ -Wertes im Vergleich zu den korrespondierenden Aminosäureamiden auf 381 M<sup>-1</sup>, während die  $p^{-1}$ -Werte in Reaktionen mit Bz-Xaa-OGp als Acyldonor in etwa gleich blieben. Im Gegensatz zu diesem gut akzeptierten Nukleophil wiesen die übrigen untersuchten Acyltransferreaktionen ähnliche oder niedrigere  $p^{-1}$ -Werte auf. Dabei wurde das Nukleophil MAAAG in Kombination mit Guanidionophenylestern am besten akzeptiert (Bz-Phe-OGp: 1380 M<sup>-1</sup> / Bz-Gly-OGp: 1300 M<sup>-1</sup>).

### 3.2.2 Entwicklung eines Screening-Systems für D-stereospezifisches Trypsin

Nachdem SSAI-Trypsin die vorhergesagten Eigenschaften der erhöhten Plastizität und verminderten Stringenz zumindest gegenüber benzoylierten Aminosäuremethylestern im S<sub>1</sub>-Substratbindungsort aufwies, wurde diese Trypsinvariante als Gerüstvariante für die Entwicklung eines Screeningsansatzes zur Erzeugung D-stereospezifischer Varianten gewählt. In einem ersten Schritt wurde das Enzym auf seine zu mutierenden Bereiche betreffend ihres Einflusses auf Substratspezifität, Aktivität und Stereoselektivität untersucht. Diese bioinformatischen Vorstudien wurden mit dem Programm HotSpotWizard durchgeführt, welches sowohl auf einem Datenbankabgleich als auch auf der Verwendung verschiedener bioinformatischer Strukturprogramme basiert (Pavelka *et al* 2009). Als Matrize für diese Studie wurde die Kristallstruktur von anionischem Rattentrypsin R96H im Komplex mit Benzamidin verwendet (PDB-ID: 1AND) (McGrath *et al.*, 1993). In der Folge konnten die Bereiche des S<sub>1</sub>-Substratbindungsortes, welche von Loop 189 (DSCQ), von Loop 215 (VSWGYGCS) und von Loop 226 (YVGP) gebildet werden, als besonders mutagene Bereiche identifiziert werden (**Abb. 3.11 A**, in Schwarz). Um das Optimierungspotential der einzelnen

Aminosäurereste innerhalb dieser Bereiche besser einschätzen zu können und um eventuell hoch-konservierte Aminosäurereste zu schützen, wurde zusätzlich der Konservierungsgrad innerhalb dieser Bereiche untersucht. Für diese bioinformatische Studie wurde das Programm ConSurfDB verwendet, welches einen Homologieabgleich von Proteinen aufgrund ihrer Sekundärstrukturen durchführt (Glaser *et al* 2005). Dabei wurde die gleiche Matrize wie schon bei der Mutagenese-Studie verwendet.



**Abb. 3.11 Übersicht zu mutierenden Bereiche von Trypsin sowie deren Konservierungsgrad (KG) innerhalb der Gruppe Trypsin-ähnlicher Enzyme.** Dargestellt sind die Ergebnisse der bioinformatischen Studien zur Ermittlung potentieller Bereiche für die gelenkte Evolution von Trypsin (A). Als besonders vielversprechend konnten dabei die *Loops* 189, 215 und 226 (in Schwarz) ermittelt werden. Zur besseren Orientierung innerhalb des Enzyms ist zudem die katalytische Triade bestehend aus His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup> und Ser<sup>195</sup>, sowie der Inhibitor Benzamidin und Cu<sup>2+</sup> geteigt (alle in Grau, Stabmodell bzw. Sphären). Um das Potential für die gelenkte Evolution besser einschätzen zu können, wurde zudem der Konservierungsgrad (KG) der einzelnen Residuen in den *Loops* 189 (DSCQ), 215 (VSWGYGCS) und 226 (YVGP) ermittelt (B-D). Hierbei folgt die Kolorierung der Aminosäuren entsprechend ihrer Konservierung (von Grau (variabel) zu Schwarz (hoch konserviert), Stabmodell). Residuen, die kein Ziel für die Evolution darstellen, sind zudem kursiv gekennzeichnet. /Methoden: HotSpotWizard (A), ConSurfDB (B-C). Anionisches Rattentrypsin R96H im Komplex mit Benzamidin (PDB-ID 1AND) diente in beiden Fällen als Template (McGrath *et al.*, 1993).

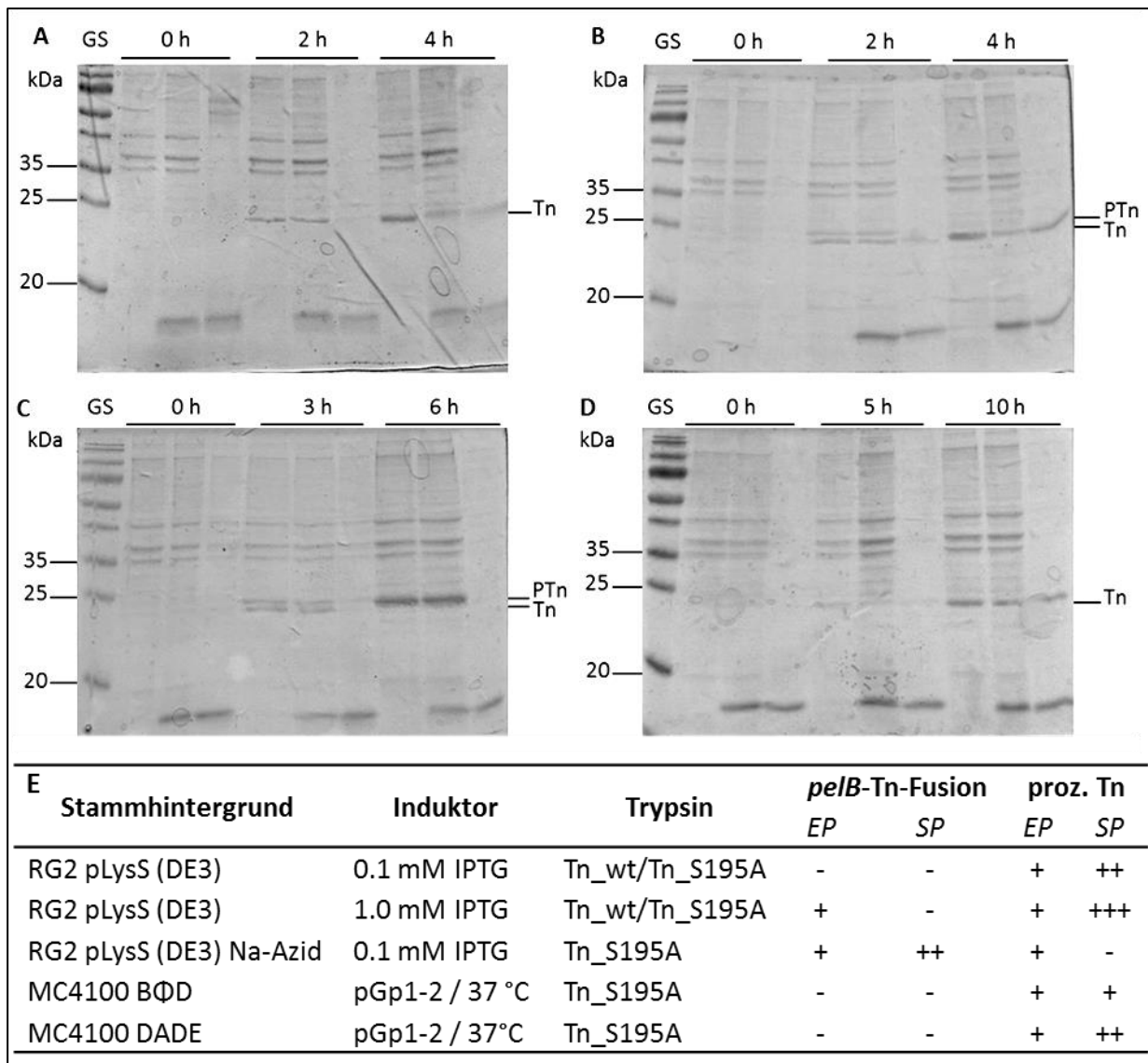
Die Analyse ermittelte einen hohen Konservierungsgrad für die *Loops* 189, 215 und 226 (Abb. 3.11 B-D, in verschiedenen Graustufen, wobei Hellgrau den variablen und Schwarz den konservierten Bereichen entsprach). Hierbei wurden die höchsten Konservierungsgrade für die Aminosäureresiduen Cys<sup>191</sup>, Cys<sup>221</sup> und Tyr<sup>228</sup> erreicht. Ausgehend von diesen Studien wurden somit 3 verschiedene Evolutionsbibliotheken geplant. Die erste umfasste dabei den

*Loop* 189, wobei die Aminosäurereste Asp<sup>189</sup>, Ser<sup>190</sup> und Gln<sup>192</sup> mutiert wurden. Die zweite Bibliothek bildete der *Loop* 226 mit den Aminosäureresten Pro<sup>225</sup>, Gly<sup>226</sup>, Val<sup>227</sup> und Tyr<sup>228</sup>. Die dritte geplante Bibliothek wurde aus den Aminosäureresten des *Loops* 215 (Val<sup>213</sup> bis Ser<sup>220</sup>) gebildet, wobei Trp<sup>215</sup> und Cys<sup>219</sup> unverändert blieben. Um dies zu bewerkstelligen, wurden die Bibliotheken auf DNA-Ebene generiert, wobei NNK-Codons an den jeweiligen Positionen verwendet wurden. Als Klonierungs- und Biosynthesevektor wurde ein pET-22b-Vektor verwendet, welcher *N*-terminal eine *pelB*-Sequenz trägt. In Kombination mit einem geeigneten *E. coli*-Biosynthesestamm wäre es somit möglich, Trypsinvarianten in aktiver Form im Periplasma der Zellen anzureichern. Diese Art der Biosynthese hätte zudem den Vorteil, im Fall Zellwand-permeabler Substrate ein direktes Signal zu erhalten und gleichzeitig die mögliche Toxizität der Trypsinvarianten im Biosynthesestamm zu umgehen.

Zunächst wurde die Biosynthese von aktivem SSAI-Trypsin in diversen *E. coli*-Stämmen mit und ohne T7-Polymerase (BL21 pLysS, Rosetta gami/RG2, XL1-Blue, JM-109, BLR) untersucht. Trotz Vorversuchen zur Anpassung der Anzuchtsbedingungen und des Induktors gelang die Biosynthese von aktivem SSAI-Trypsin lediglich im Stamm *E. coli* RG2 pLysS (DE3) (**Abb. 3.12 A und B**). Dieser Biosynthesestamm trug eine *trxB/gor* Mutation, was ein reduzierendes Milieu im Periplasma zur Folge hatte (Berkmen, 2012). In Kombination mit dem verwendeten *pelB*-Transportsignal, welches eine Sekretion über das Sec-Sekretionssystem ermöglichte, bedeutete dies, dass die Faltung von aktivem Trypsin im Periplasma erfolgen müsste. Eine solche, nur auf thermodynamischen Triebkräften basierende Faltung, setzt die korrekte Ausbildung von 6 Disulfidbrücken voraus. Um den Einfluss des Tat-Sekretionssystems, welches den Transport von gefalteten Proteinen ermöglicht, zu untersuchen, wurde die Proteinsekretion außerdem innerhalb verschiedener Stämme unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Um zunächst Toxizitätseffekte auszuschließen wurde die inaktive SSI-Trypsinvariante mit Austausch des katalytischen Serins (S195A) verwendet. Die zeitliche Bildung von SSAI-S195A-Trypsin wurde im reduzierenden SDS-PAGE visualisiert (**Abb. 3.12**). So kam es bei Verwendung von 0,1 mM IPTG zu keinem Zeitpunkt zur sichtbaren Synthese des *pelB*-SSAI-S195A-Trypsin Fusionsproteins (**Abb. 3.12 A**). Bei höheren Induktorkonzentrationen von 1 mM hingegen war im frühen Verlauf der Proteinsynthese nach zwei Stunden eine Migrationsbande auf Höhe von etwa 26 kDa zu beobachten, welche jedoch nicht in der Periplasmafraktion der Zellen auftrat (**Abb. 3.12 B**). Daher ist davon auszugehen, dass es sich dabei um das *pelB*-SSAI-S195A-Trypsin-Fusionsprotein handelte.

In einem weiteren Versuch wurde die Proteinsynthese mit 0,1 mM IPTG induziert und nach 15 Minuten mit einer Konzentration von 5 mM Na-Azid gestoppt, welches SecY, eine Komponente des Sec-Transportweges, inhibierte (**Abb. 3.12 C**) (Oliver *et al.*, 1990).





**Abb. 3.12 Untersuchung des Transports während der Biosynthese von SSAl-Trypsin.** Dargestellt sind Elektropherogramme der Proteinbiosynthese von SSAl-S195A-Trypsin bezüglich verschiedener Anzuchtbedingungen bzw. *E. coli*-Stämme. Es sind zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils die Gesamtzellfraktion, die Periplasmafraktion sowie die Pellet-Fraktion separiert worden. Die Anzuchtbedingungen variierten dabei wie folgt: **(A)** Standardbedingungen (*E. coli* RG2 pLysS (DE3), pET 22b SSAl-S195A-Trypsin, 100 µM IPTG, 4 h Biosynthese, 37 °C, 180 rpm), **(B)** erhöhte Induktorkonzentration (Standardbedingungen, 1 mM IPTG), **(C)** Anti-Sec-Bedingungen (Standardbedingungen, 0,1 mM IPTG, Zugabe von 5 mM Na-Azid nach 1 h Proteinbiosynthese) und **(D)** Tat-Defizienz-Bedingungen (*E. coli* DADE (MC4100  $\Delta$ *tatA-E*), pLysSRARE, pGEP12, Induktion 42 °C, Biosynthese: 30 °C). **(E)** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse unter Berücksichtigung des exprimierten Konstruktes SSAl-Trypsin (Tn<sub>wt</sub>) und SSAl-S195A-Trypsin (Tn<sub>S195A</sub>) in der exponentiellen Phase (EP) und der stationären Phase (SP) / Zur Anzucht wurde in allen Fällen LB-Medium genutzt. / Die Trypsinvariante migriert bei etwa 24 kDa, die *pelB*-Trypsinfusionen bei etwa 26 kDa. / Elektropherogramm: 15 % (w/v Acrylamid) SDS-PAGE, Coomassie-Blaufärbung, Größenstandard (GS); Proteinmarker VI AppliChem, Trypsin (Tn), *pelB*-Trypsin (PTn).

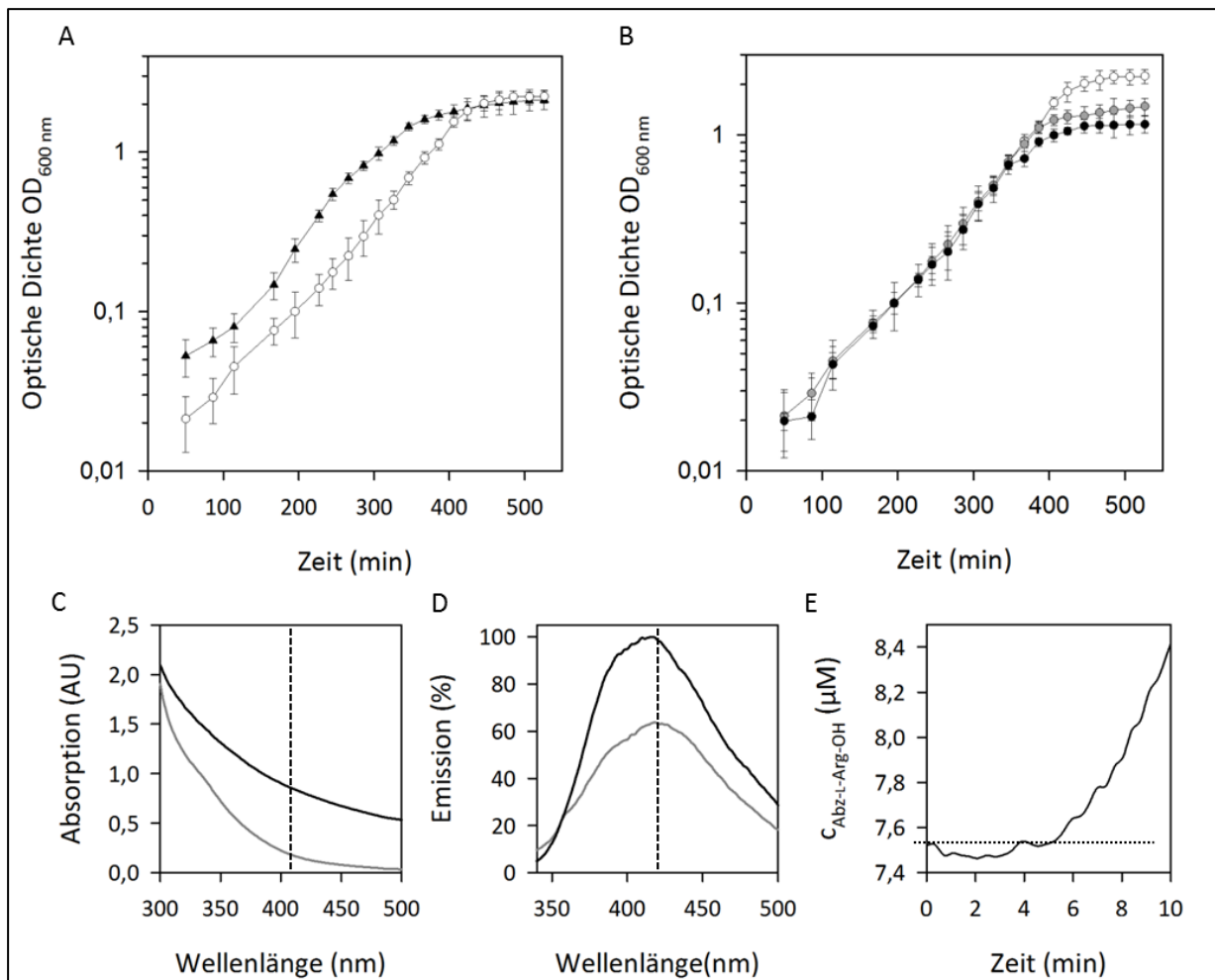
Hierbei waren im frühen Verlauf der Synthese erneut zwei Migrationsbanden auf Höhe von 24 kDa und 26 kDa sichtbar. Im Verlauf der Synthese war nach 6 Stunden jedoch keine Bildung von SSAl-S195A-Trypsin mehr sichtbar, was den Rückschluss zuließ, dass selbiges in

*Escherichia coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS über den Sec-Transportweg sekretiert wurde. Um dies zu bestätigen, wurde die Biosynthese in weiteren Versuchen im Hintergrund von Tat-defizienter MC4100-Stämmen untersucht. Hierbei erfolgte – anders als bei der Biosynthese in *E. coli* RG2 pLysS (DE3) – die Induktion durch Synthese einer plasmidkodierten T7-RNA-Polymerase vom pGP1-2-Plasmid mittels einer kurzzeitigen Erhöhung der Temperatur (Tabor & Richardson 1992). Bei beiden untersuchten Stämmen (BΦD, DADE), konnte eine Biosynthese von SSAI-Trypsin-S195A sichtbar gemacht werden, was durch eine Migrationsbande sowohl in der Gesamtzellfraktion als auch der Periplasmafraktion bei etwa 24 kDa deutlich wird (**Abb. 3.12. C**).

Die direkte Untersuchung der Aktivität von SSAI-Trypsin in der Periplasmafraktion war nicht möglich. Zwar wurde das Protein synthetisiert (**Abb. 3.12 A**), jedoch konnte mit Hilfe des IQFS Abz-L-Arg-L-Ala- $\rho$ NA keine Aktivität festgestellt werden. Gründe dafür waren sowohl mangelnde Zellwandgängigkeit des Substrates, als auch ein starker Fluoreszenz-Hintergrund des initial zur Anzucht genutzten LB-Mediums. So wies dieses eine Absorption von etwa 0,9 bei einer Wellenlänge von 405 nm und eine erhöhte Fluoreszenz auf (**Abb. 3.13 C und D**, schwarze Linie). Um dies zu umgehen, wurden verschiedene Medien auf ihre Eignung im Screening-System getestet, wobei sich ein modifiziertes M9-Medium (Screening-Medium) als geeignet zeigte. Dieses Medium wies eine deutlich verringerte Absorption Eigenfluoreszenz auf. Zwar resultierten aus der Verwendung dieses Screening-Mediums bei der Anzucht von *E. coli* RG2 pLysS (DE3)-Zellen im Vergleich zu LB-Medium eine verzögerte log-Wachstumsphase, aber auch höhere Zelldichten (**Abb. 3.13 A**).

Bei der Untersuchung des Einflusses der Proteinbiosynthese auf das Wachstum der Zellen war eine Verringerung der finalen  $OD_{600\text{ nm}}$  festzustellen. Dabei war zu bemerken, dass Zellen mit SSAI-Trypsin mit einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 1,5 deutlich reuzierter wuchsen als solche, welche die inaktive SSAI-S195A-Trypsinvariante trugen und eine finale  $OD_{600\text{ nm}}$  von 1,8 erreichten (**Abb. 3.13 B**). Abschließend wurde das Screening-Medium für die Eignung der Aktivitätsdetektion nach vorherigem Ultraschallaufschluss SSAI-Trypsin getestet, wobei eine Detektionsuntergrenze von etwa 7,5  $\mu\text{M}$  von Abz-L-Arg-L-Ala- $\rho$ NA festgestellt wurde (**Abb. 3.13 E**).

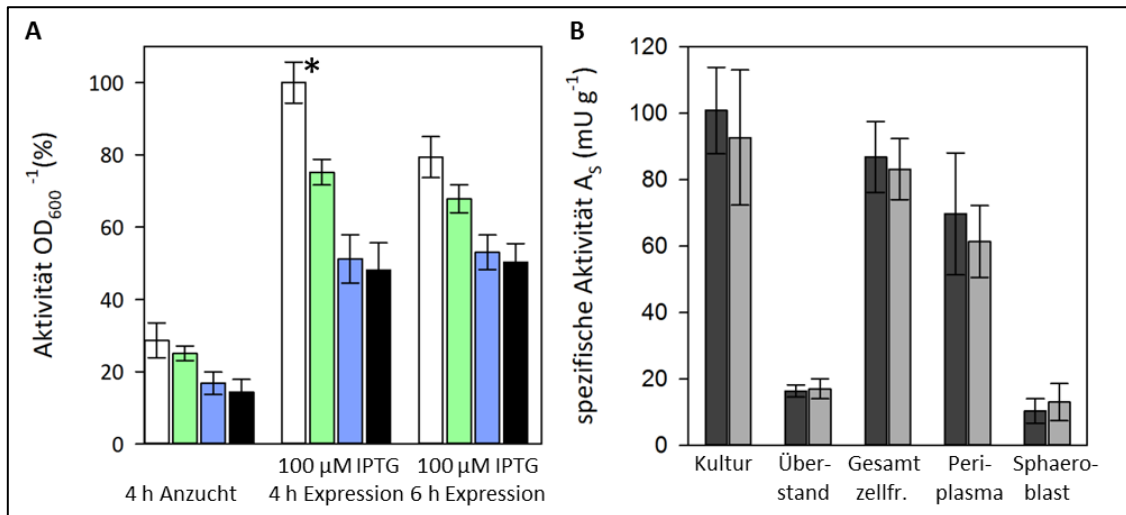
In folgenden Experimenten wurde versucht, das Biosynthesystem auf einen MTP-Maßstab zu übertragen, wie es im geplanten Screening verwendet werden sollte. Dabei ließen sich Anzuchts- und Induktionsbedingungen problemlos übertragen, während der Zellaufschluss aufgrund der nicht vorhandenen Zellwandgängigkeit des IQFS optimiert werden musste. Deshalb wurden SSAI-Trypsin-synthetisierende *E. coli* RG2 pLysS (DE3)-Zellen angezogen und die relative Aktivität bezogen auf die  $OD_{600\text{ nm}}$  im Kulturüberstand der jeweiligen Kavitäten zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des Substrates Abz-L-Arg-L-Ala- $\rho$ NA bestimmt.



**Abb. 3.13 Einfluss des Kulturmediums auf das Wachstum von *E. coli* und die Detektionsgrenzen des Substrates Abz-L-Arg-L-Ala-pNA.** Dargestellt sind die Wachstumskurven von *E. coli* RG2 pLys (DE3) in LB-Medium (schwarze Dreiecke) und M9-Screening-Medium (weiße Kreise) (A). Zusätzlich wurde der Einfluss des M9-Screening-Mediums auf das Wachstum von SSAI-Trypsin- (schwarze Kreise) und SSAI-S195A-Trypsin-synthesierenden *E. coli* RG2 pLys (DE3)-Stämmen (graue Kreise) untersucht (B). Ergänzend sind die Spektren von pNA (Absorption) (C) und Abz-OH (Emission) (D) in den beiden Medien (LB-Medium in Schwarz, M9-Screening-Medium in Grau) dargestellt. Die jeweiligen Detektionswellenlängen (405 nm (pNA), 420 nm (Abz-OH)) sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Fluoreszenzdetektionsgrenze für Abz-L-Arg-OH konnte zu etwa 7,5 μM bestimmt werden (E). /Reaktionsbedingungen: Wachstumskurven: 50 mL Medium, 37 °C, 180 rpm, *E. coli* RG2 pLys (DE3) (Wildtyp oder pET 22b-SSAI-Trypsin/ pET 22b-SSAI-S195A-Trypsin), Induktionszeitpunkt: 4 h mit 100 μM IPTG (B und E), Proteinbiosynthesedauer: 4 h /Spektren: 400 μM pNA (C)/Abz-OH ((D), λ<sub>ex</sub> 320 nm) /Detektionsgrenzenbestimmung: Ultraschallaufschluss (1 min, 30 % Amplitude), Messung: 100 μl Kulturüberstand, 100 μl Messpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,8), 400 μM Abz-L-Arg-L-Ala-pNA, λ<sub>ex</sub> 320 nm, λ<sub>em</sub> 420 nm.

Als Aufschlussmethoden wurden dabei alternativ die Gefrier-Tau-Methode (Grün), Lysozym-Behandlung (Blau) und ein dreiminütiger Aufschluss im Ultraschallbad (Weiß) im Vergleich zum unbehandelten Kulturüberstand (Kontrollaktivität/Schwarz) verwendet (Abb. 3.14 A). Im Fall der Anzucht jener Zellen, welche SSAI-Trypsin synthetisieren, die mittels optimierter Bedingungen angezogen wurden, war die Aktivität gegenüber dem L-IQFS deutlich erhöht, was auf die Synthese von aktivem und demnach korrekt gefaltetem SSAI-Trypsin hindeutet.

Durch Betrachtung der Anzucht der *E. coli* RG2 pLysS (DE3)-Zellen ohne Plasmid wurde deutlich, diese immer noch 15 % bis 30 % Fluoreszenz aus dem L-IQFS-Hydrolyse aufwiesen. Diese residuale Aktivität gegenüber dem Substrat lässt sich vermutlich auf das Proteasom der verwendeten Zellen zurückführen. Die relative Aktivität erreichte dabei nach etwa 4 Stunden ihr Maximum und verringerte sich nach 6 Stunden um 22 % (**Abb. 3.14 A**).



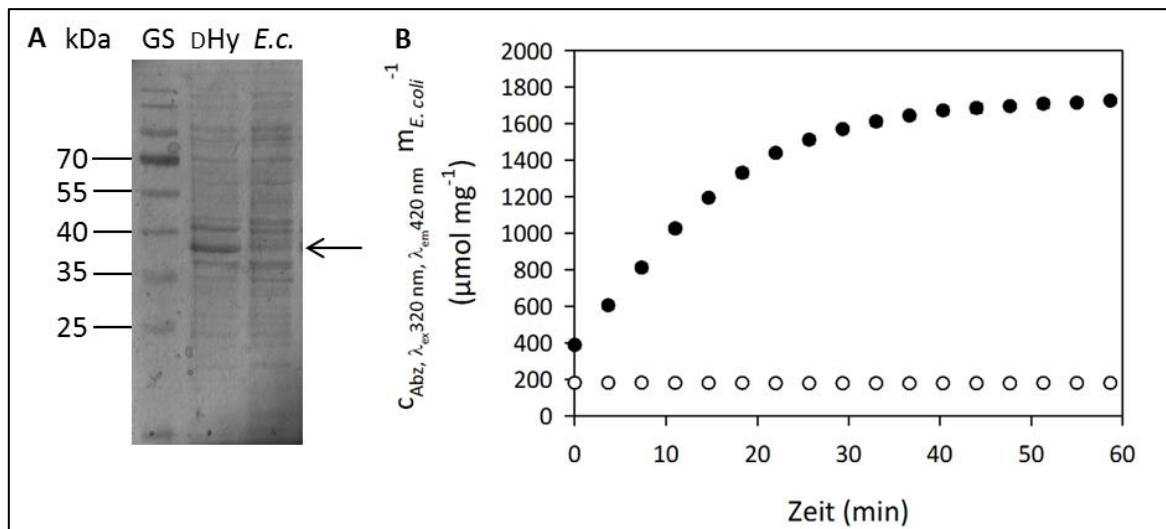
**Abb. 3.14 Darstellung der Optimierung der Aufschlussbedingungen zur Detektion von SSAI-Trypsin durch das Selektionssubstrat.** Dargestellt ist die prozentuale Aktivität der Periplasmafraktionen in Relation zur maximalen Aktivität (Stern) gegenüber dem Substrat Abz-L-Arg-L-Ala-pNA (**A**). Hierbei wurden sowohl Aufschlussbedingungen (Ultraschall in Weiß, Gefrier-Tau-Aufschluss in Grün, Lysozym-Behandlung in Blau, Kulturüberstand Zellen in Schwarz) als auch Anzuchtsbedingungen variiert. Die maximale Aktivität wurde bei Kulturen, welche mit 100 μM IPTG induziert wurden und 4 Stunden synthetisierten, mittels Ultraschall aufgeschlossen wurden ermittelt. Demgegenüber wurde die spezifische Aktivität von verschiedenen Fraktionen der *E. coli* RG2 (DE3)pLys-Zellen gegenüber dem Substrat Abz-D-Arg-D-Ala-pNA untersucht (**B**). Hierbei wurden die Gesamtkultur, der Kulturüberstand, die Gesamtzellfraktion, sowie Periplasma- und Pellet-Fraktion hinsichtlich Fluoreszenz (Schwarz) und Absorption (Grau) analysiert. /Reaktionsbedingungen: 50 ml / 400 ml M9-Screening-Medium, 37 °C, 180 rpm, *E. coli* RG2 pLys (DE3) (pET 22b SSAI-Trypsin (**A**) oder nicht-Plasmid-tragende Zellen(**B**)), Induktionszeitpunkt: OD<sub>600 nm</sub> 0,5 mit 10 μM oder 100 μM IPTG, Proteinbiosynthesedauer: 4 h oder 6 h /Aufschluss (siehe 2.2.4) / Aktivitätsmessungen: 400 μM Abz-L-Arg-L-Ala-pNA (A), Abz-D-Arg-D-Ala-pNA (B), 100 μL Kulturüberstand, 100 μL Messpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,8), Messdauer: 4 h, Fluoreszenzmessung: λ<sub>ex</sub> 320 nm, λ<sub>em</sub> 420 nm, Absorptionsmessung: 405 nm.

Ein Vergleich der einzelnen Aufschlussmethoden zeigte, dass eine Inkubation mit 10 mg/ml Lysozym für 30 Minuten nicht für einen ausreichenden Aufschluss zur Detektion proteolytischer Aktivität genügte. So entsprach die erhaltene Aktivität nahezu der des Kulturüberstandes der Kontrollkultur. Beim Aufschluss mittels Ultraschallbad und der Gefrier-Tau-Methode war hingegen in beiden Fällen eine erhöhte Aktivität im Vergleich zur unlysierten Kultur messbar. Aufgrund des geringeren Zeitaufwands und der um 27 % erhöhten Aktivität wurde deshalb im weiteren Verlauf des Screenings nach D-

stereospezifischen Trypsinvarianten auf den Aufschluss mittels Ultraschallbad zurückgegriffen.

Parallel zur Optimierung des Zellaufschlusses wurde gleichzeitig der *E. coli*-Biosynthesestamm als Kontrolle für die Aktivität des SSAI-Trypsins gegenüber dem IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-pNA mitgeführt. Um diese Aktivität zu lokalisieren und zu quantifizieren, wurde in der Folge eine Protein-Fraktionierung des Stamms *E. coli* RG2 pLysS (DE3) durchgeführt (**Abb. 3.14 B**). Dabei wurden ähnlich der Bestimmung der proteolytischen Aktivität bei *Bacilli* (**Kap. 3.1.3**) sowohl die Aktivität gegenüber D-Arginin, welche durch ein steigendes Fluoreszenzsignal widerspiegelt wird (in Schwarz), als auch die Aktivität gegenüber D-Alanin bestimmt, welches eine Zunahme der Absorption (in Grau) sowie Fluoreszenz bedingt. Im Fall des *E. coli* RG2 pLysS (DE3) wurden nahezu identische Aktivitätssignale für beide Parameter ermittelt. Dieser Befund bestätigt ein Vorkommen D-Alanin-spezifischer Proteasen/Peptidasen im Proteasom von *E. coli*. Im Gegensatz hierzu konnte das Vorhandensein eines D-Arginin-spezifischen proteolytischen Enzyms unter den gegebenen Anzuchtbedingungen nahezu ausgeschlossen werden. Bei der Verteilung der D-Alanin-spezifischen Hydrolyseaktivität in den Zellen ( $101 \text{ mU g}^{-1}$ ) war auffällig, dass sich diese im Gegensatz zu den untersuchten *Bacilli*-Stämmen (**Kap. 3.1.3**) nicht im Kulturüberstand ( $18 \text{ mU g}^{-1}$ ) befand, sondern vielmehr in der Gesamtzellfraktion ( $92 \text{ mU g}^{-1}$ ). Durch weitere Fraktionierung der Zellen konnte 84 % der Hydrolyseaktivität innerhalb der Periplasmafraktion nachgewiesen werden, während die übrige Aktivität innerhalb der Sphaeroblastenfraktion lokalisiert war.

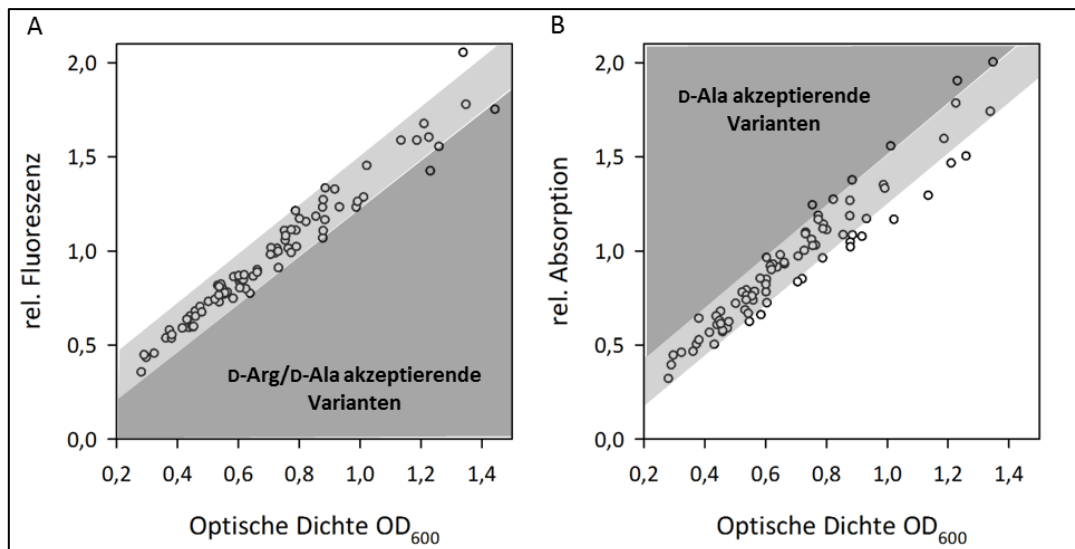
Um die Eignung des entwickelten Systems zur Detektion D-Aminosäure-spezifischer Trypsinvarianten zu evaluieren, wurde heterolog DHy-synthetisierende *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS als Positivkontrolle und nicht-Plasmid-tragenden Zellen als Hintergrundaktivität mitgeführt (**Abb. 3.15**). Die Anzucht erfolgte im 96-well-MTP-Format unter Verwendung des Screening-Mediums. Durch Analyse mittels reduzierender SDS-PAGE konnte die Biosynthese von DHy unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden (**Abb. 3.15 A** / Pfeil). Im Folgenden konnte die Aktivität der DHy in einem Zeitraum von 60 Minuten bis zum Verbrauch des Substrates gezeigt werden (**Abb. 3.15 B**). Im Gegensatz hierzu wiesen in diesem Zeitraum Plasmid-freie *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS-Kulturen einen Bruchteil der hydrolytischen Aktivität gegenüber dem IQFS auf.



**Abb. 3.15 Übertragung des optimierten Screeningsystems auf dHy.** Dargestellt ist die Biosynthese (A) und der Nachweis der Aktivität (B) von dHy (Schwarz) im Vergleich zu *E. coli* RG2 pLysS (DE3)-Zellen (*E.c.*, Weiß). / Reaktionsbedingungen: (A) Elektropherogramm: 15 % (w/v Acrylamid) SDS-PAGE, Coomassie-Blaufärbung, Größenstandard (GS): Proteinmarker VI AppliChem, dHy (dHy / Pfeil), *E. coli* RG2 pLysS (DE3) (*E.c.*) / (B) 2 mM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 100  $\mu\text{L}$  Kulturüberstand, 100  $\mu\text{L}$  Messpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,8), Messdauer: 1 h, Fluoreszenzmessung:  $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm.

### 3.2.3 Linearisierung der Ergebnisse des Screenings

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass das entwickelte System zur Detektion heterolog exprimierter D-Aminosäure-spezifischer Enzyme wie dHy aus *B. thuringiensis* übertragbar war, wurde der Ansatz für die evolutive Optimierung von Trypsin verfolgt. Hierfür wurden die dargestellten DNA-Bibliotheken (Kap. 2.3.4) in *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS transformiert und selbige wie beschrieben kultiviert (Kap. 2.4.5). Im Gegensatz zu den Vorversuchen, bei denen SSAI-Trypsin mit dem *all*-L-IQFS bzw. dHy mit dem IQFS verwendet wurde (Kap. 3.2.2), wurde die Reaktionszeit zur besseren Differenzierung auf 60 bis 84 Stunden erhöht werden. Die durch nativ im Biosynthesestamm synthetisierten DSP verursachte Hintergrundaktivität korrelierte dabei linear mit der optischen Dichte bei 600 nm und damit der Zellmenge, was eine Auftragung gegen die Signale einzelner Kavitäten einer 96-well-MTP innerhalb eines Diagrammes erlaubte (Abb. 3.16). Diese Linearisierung war zudem notwendig, da das Wachstum der Kulturen in den Kavitäten und damit die  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  stark variierten. Als ursächlich hierfür erwiesen sich die Verfügbarkeit von Sauerstoff, die Toxizität einzelner Konstrukte sowie Temperaturgradienten innerhalb einer 96-well-MTP. Um diese Effekte abzumildern, wurde initial ein Normalisierungsfaktor für jede einzelne Platte bezogen auf die erhaltenen Fluoreszenz- bzw. Absorptionssignale ermittelt (Gl. 3.1).



**Abb. 3.16** Darstellung der Selektionsparameter am Beispiel einer 96-well Mikrotiterplatte der ersten Screeningrunde der Bibliothek 226. Dargestellt ist die Linearisierung der Screening-Ergebnisse entsprechend der Auftragung der relativen Fluoreszenz gegen die optische Dichte OD<sub>600 nm</sub> (A) bzw. der relativen Absorption gegen die optische Dichte (B). Jeder einzelne aufgeführte Punkt repräsentierte hierbei die Kavität einer 96-well-MTP mit entsprechend etwa 20 verschiedenen SSAI-Trypsinvarianten. Zusätzlich wurde die Fläche der natürlichen Streuung der Kavitäten (Grau) und die Fläche putativ D-Aminosäure-akzeptierender Kavitäten (Dunkelgrau) in beiden Diagrammen hervorgehoben. /Reaktionsbedingungen: M9-Screening-Medium, 37 °C, 720 rpm, *E. coli* RG2 pLys (DE3) (pET 22b SSAI-Bib226-Trypsin), Induktionszeitpunkt: 2 h, 100 μM IPTG, Proteinbiosynthesedauer: 4 h /Aufschluss mittels Ultraschallbad /Aktivitätsmessungen: 400 μM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 100 μL Kulturüberstand, 100 μL Messpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,8), Inkubation: 84 h, Fluoreszenzmessung: λ<sub>ex</sub> 320 nm, λ<sub>em</sub> 420 nm, Absorptionsmessung: 405 nm.

Zur Berechnung des Normalisierungsfaktors wurde jeweils der Durchschnitt der gemessenen Absorption/Fluoreszenz in Relation zur OD<sub>600 nm</sub> aller Kavitäten einer 96-well-Mikrotiterplatte berechnet.

$$N_F = \frac{\bar{F}}{\bar{OD}_{600 \text{ nm}}} \quad N_A = \frac{\bar{A}}{\bar{OD}_{600 \text{ nm}}}$$

**Gl. 3.1** Berechnung der Normalisierungsfaktoren für die Auswertung des Screenings nach D-Aminosäure-spezifischem Trypsin. N<sub>F</sub> – Normalisierungsfaktor Fluoreszenz,  $\bar{F}$  – durchschnittlich ermittelte Fluoreszenz einer 96-well-MTP-Platte,  $\bar{OD}_{600 \text{ nm}}$  – durchschnittliche optische Dichte bei 600 nm einer 96-well-MTP-Platte, N<sub>A</sub> – Normalisierungsfaktor Absorption,  $\bar{A}$  – durchschnittlich ermittelte Absorption bei 405 nm.

Mit Hilfe dieser Normalisierungsfaktoren wurden in der Folge die relativen Fluoreszenzen bzw. relativen Absorptionen aus den gemessenen Daten berechnet. Hierbei wurde die jeweils ermittelte Fluoreszenz/Absorption auf die optische Dichte bei 600 nm in einer Kavität bezogen und anschließend mit Hilfe des Normalisierungsfaktors auf die gesamte MTP berechnet (Gl. 3.2).

$$F_{rel} = F / OD_{600\text{ nm}} \cdot N_F$$

$$A_{rel} = A / OD_{600\text{ nm}} \cdot N_A$$

**Gl. 3.2 Gleichung zur Berechnung der relativen Fluoreszenz  $F_{rel}$  und der relativen Absorption  $A_{rel}$  einer Kavität einer 96-well-Mikrotiterplatte.**  $F$  – ermittelte Fluoreszenz,  $OD_{600\text{ nm}}$  – Optische Dichte 600 nm,  $N_F$  – Normalisierungsfaktor Fluoreszenz,  $A$  – ermittelte F Absorption,  $N_A$  – Normalisierungsfaktor Absorption

Die so ermittelten relativen Parameter wurden in der Folge gegen die optische Dichte bei 600 nm aufgetragen. Hierbei war festzustellen, dass sich die Absorption direkt proportional zur  $OD_{600\text{ nm}}$  verhielt während dies bei der Fluoreszenz nicht der Fall war. Deshalb musste die Geradengleichung zur Linearisierung angepasst werden (**Gl. 3.3**).

$$F_{rel} = \frac{OD_{600\text{ nm}}}{m + n / OD_{600\text{ nm}}}$$

$$A_{rel} = m \cdot OD_{600\text{ nm}} + n$$

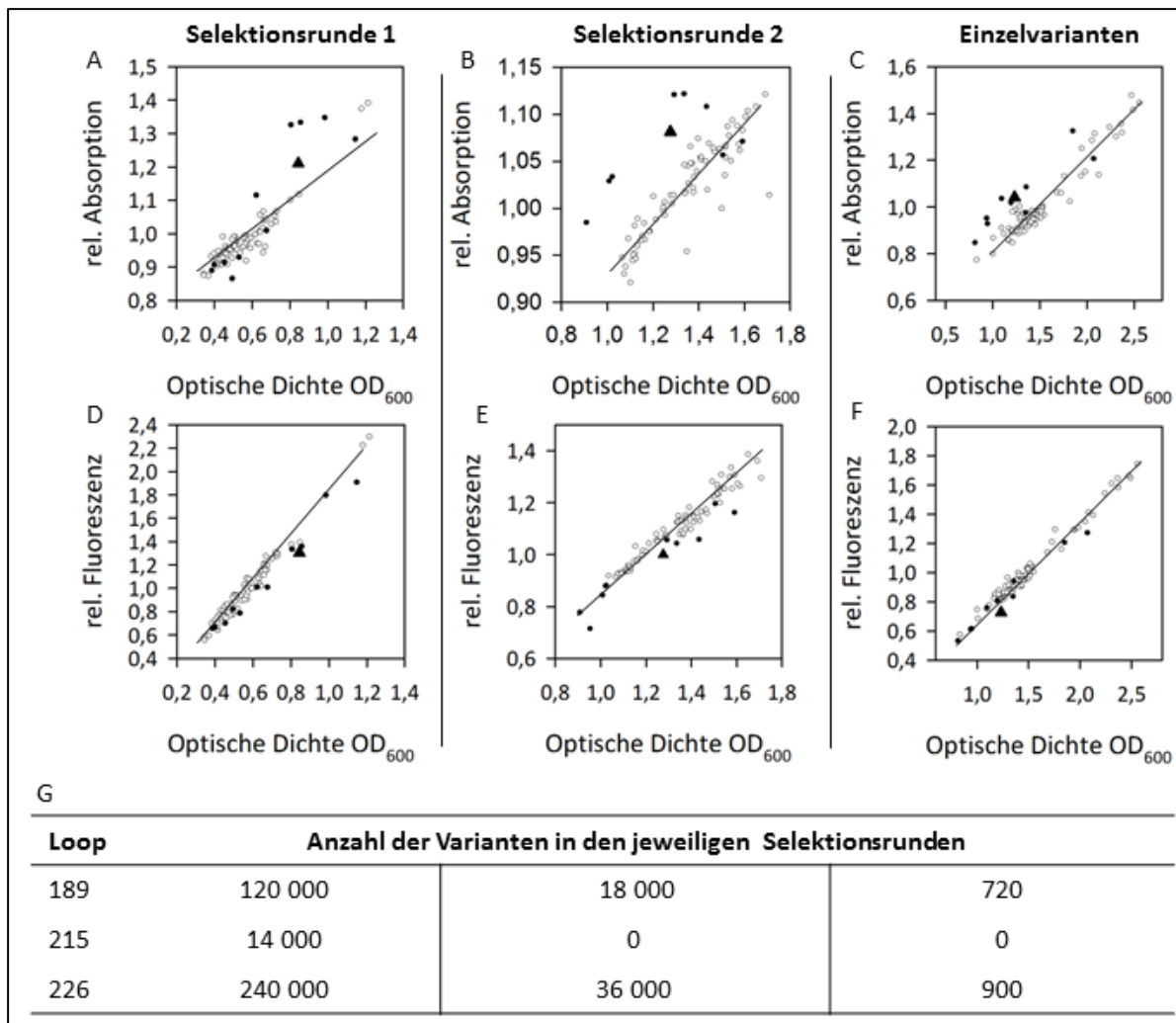
**Gl. 3.3 Gleichungen zur Linearisierung der relativen Fluoreszenz  $F_{rel}$  und der relativen Absorption  $A_{rel}$  in einer 96-well-Mikrotiterplatte.**  $m$  - Anstieg,  $n$  – Verschiebung, Optische Dichte bei 600 nm.

Die so erhaltenen Werte für die einzelnen Kavitäten einer MTP wurden anschließend im Diagramm aufgetragen und ausgewertet (**Abb. 3.16**). Bemerkenswert war, dass sich die meisten Kavitäten entlang eines Varianzbereiches befanden und dementsprechend nur Kavitäten, welche außerhalb lagen, für die nächste Runde bzw. Analyse berücksichtigt wurden. Im Fall der Fluoreszenz hatte die indirekt proportionale Auftragung zur Folge, dass sich Kavitäten mit D-Arginin/D-Alanin proteolytischer Aktivität unterhalb des Varianzbereiches befanden. Im Fall der Absorption befanden sich aufgrund der direkten Proportionalität die positiven Signale oberhalb des Korridors. Zur Auswahl der Kavitäten, welche weiterführend im Screening untersucht werden sollten, wurden diese Varianzbereiche für jede Platte manuell neu festgelegt.

### 3.2.4 Ergebnisse des Screenings nach D-stereospezifischem Trypsin

Für das eigentliche Screening nach D-Arginin/D-Alanin-spezifischem Trypsin wurde in der erste Runde die Kavität einer MTP mit ca. 20 verschiedenen Trypsinvarianten tragenden in *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3)pLysS-Klonen angezogen und ausgewertet (**2.4.5** und **3.2.3**). Hierbei war auffällig, dass sich die linearisierten Graphen in den einzelnen Runden des Screenings sowie innerhalb und zwischen den verschiedenen Bibliotheken teils sehr deutlich unterschieden. So war der Anteil der putativen D-Arg/D-Ala akzeptierenden Varianten bei der Bibliothek des *Loops* 189 am höchsten, während in der Bibliothek des *Loops* 215 nahezu keine Kavitäten Abweichungen von den gemittelten Parametern der Platte zeigten.





**Abb. 3.17 Übersicht der durchgeführten Selektionsrunden von SSAl-Trypsin im Allgemeinen und Identifikation von SSAl-GFTT-Trypsin.** Dargestellt sind die Resultate der 1. bis 3. Selektionsrunde der SSAl-Bib189-Trypsin-Bibliothek hin zur Isolation der Einzelvariante SSAl-GFTT-Trypsin (A–F). Hierbei wurden sowohl die relative Fluoreszenz (A–C), als auch die relativen Absorption gegen die optische Dichte OD<sub>600 nm</sub> (D–F) aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert eine Kavität einer 96-well-MTP entsprechend etwa 20 verschiedenen SSAl-Bib189-Trypsinvarianten. Kavitäten/Varianten, mit erhöhtem Signal welche in die nächste Selektionsrunde übernommen wurden, sind zudem mit einem schwarzen Kreis markiert, die SSAl-GFTT-Trypsinvariante hingegen mit einem schwarzen Dreieck. Ergänzend ist die Anzahl der durchmusterten Varianten der Bibliotheken 189, 215 und 226 in den jeweiligen Selektionsrunden tabellarisch angegeben (G). /Reaktionsbedingungen: M9-Screening-Medium, 37 °C, 720 rpm, *E. coli* RG2 pLys (DE3) (pET 22b SSAl-Bib189-Trypsin), Induktionszeitpunkt: 2 h, 100 μM IPTG, Proteinbiosynthesedauer: 4 h /Aufschluss mittels Ultraschallbad / Aktivitätsmessungen: 400 μM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 100 μL Kulturüberstand, 100 μL Messpuffer (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,8), Inkubation: 84 h, Fluoreszenzmessung:  $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm, Absorptionsmessung: 405 nm.

Aufgrund dieses Ergebnisses und der Tatsache, dass das Screening-System eine Abdeckung der Varianz dieser Bibliothek nicht ermöglichte, wurde in der Folge auf eine weitere Mutagenese und Screening des Loops 215 verzichtet. Anders gestaltete sich dies bei den Bibliotheken des Loops 189 und des Loops 226 (Abb. 3.16 und Abb. 3.17), bei welchen eine Abdeckung von 99,4% (Loop 189) und 39,7% (Loop 226) der theoretischen Anzahl benötigter Varianten zur sättigenden Mutagenese erreicht werden konnte (Firth & Patrick,

2008). Bei der Analyse der Einzelvarianten von *Loop* 226 konnten jedoch keine Varianten mit gegenüber dem Zell-Mittel erhöhter Hydrolyseaktivität gegenüber dem Screeningsubstrat Abz-D-Arg-D-Ala-pNA identifiziert werden. Anders gestaltete sich dies bei der Durchmusterung der Bibliothek des *Loops*-189, was exemplarisch an den Resultaten von drei 96-well-MTP gezeigt wurde (**Abb. 3.17**). Hier wurden abweichende Kavitäten mit einem schwarzen Punkt/Dreieck gekennzeichnet, welche in die nächste Runde des Screenings überführt wurden. Bei Vergleichen der einzelnen Runden des Screenings miteinander war auffällig, dass die Varianz der Verteilung vermeintlich positiver Kavitäten zwischen erster und zweiter Runde des Screenings zuzunehmen schien, was auf eine Anreicherung positiver Klone schließen ließ. Von insgesamt fünf Einzelvarianten der dritten Runde des Screenings der Bib189 wurden Plasmide zur Sequenzierung gesendet (**Tab. 3.10**). Es traten außerhalb des mutierten Bereiches keine Nukleotidaustausche auf. Nach Subklonierung ins pST/pYT-System und Synthese der Einzelvarianten in *S. cerevisiae* (**Kap. 2.4.3**) wurden spezifischen Aktivitäten der gereinigten Varianten gegenüber dem IQFS bestimmt. Ergänzend wurden die Varianten auf Reaktivität gegenüber den Methylestern Bz-D-Arg-OMe und Bz-D-Ala-OMe sowie ihrer korrespondierenden Stereoisomere untersucht (**Tab. 3.10**). Dabei konnte bei SSAI-PCPG-Trypsin und SSAI-REYF-Trypsin nur geringe spezifische Aktivitäten gegenüber den untersuchten Substraten festgestellt werden. Die Trypsinvarianten SSAI-ACMN und SSAI-GFTT zeigten zusätzlich zur Aktivität beim Umsatz des IQFS auch spezifische Aktivitäten gegenüber Bz-D-Arg-OMe (5,1 / 7,3 mkat mol<sup>-1</sup>) und Bz-D-Ala-OMe (7,0 / 147 mkat mol<sup>-1</sup>).

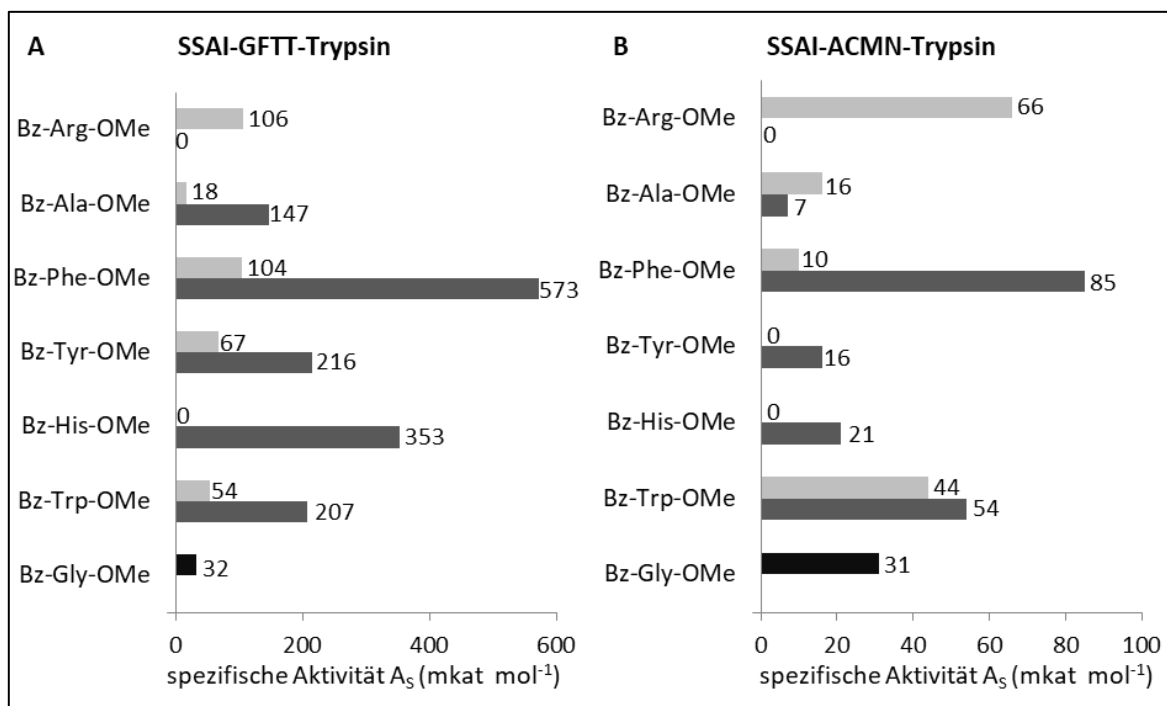
**Tab. 3.10 Übersicht über die spezifischen Aktivitäten der fünf SSAI-Bib189-Trypsinvarianten im Vergleich zu SSAI-Trypsin<sup>8</sup>.**

Aminosäurerest in				spezifische Aktivität A <sub>s</sub> (mkat mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>				
Trypsin				Abz-D-Arg-D-Ala-pNA	Bz-L-Arg-OMe	Bz-D-Arg-OMe	Bz-L-Ala-OMe	Bz-D-Ala-OMe
189	190	191	192					
G	F	T	T	0,18 <sup>b</sup>	106	7,3	18,4	147
A	C	M	N	< 0,05	66,3	5,1	16,2	7,0
R	E	Y	F	n. d. <sup>c</sup>	6,1	0,05	n. d.	n. d.
P	C	P	G	n. d.	11,2	n. d.	n. d.	n. d.
V	V	D	G <sup>d</sup>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
SSAI-Typsin								
D	S	C	Q	n. d.	3550	n. d.	112	n. d.

<sup>a</sup>Reaktionsbedingungen: Biosynthese und Reinigung der Varianten siehe **2.4.3** /100 mM HEPES (pH 7,8), 100 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 2 mM Bz-D/L-Xaa-OMe/400 µM Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, 50 µM SSAI-Trypsin bzw. SSAI-Bib189-Trypsin / Die Analyse der Reaktionen erfolgten mittels UPLC (variable Gradienten, 3 min, λ 254 nm). Die Messabweichung betrug < 10 %. /<sup>b</sup> Lediglich pNA konnte mittels UPLC nachgewiesen werden. /<sup>c</sup> n. d. – Ein Umsatz konnte nicht detektiert werden. /<sup>d</sup> n. b. – Aktivitäten der Variante konnten aufgrund der Enzymlöslichkeit nicht bestimmt werden.

<sup>8</sup> Teile der hier dargestellten Daten wurden im Rahmen der betreuten Masterarbeit von G.Höger generiert.

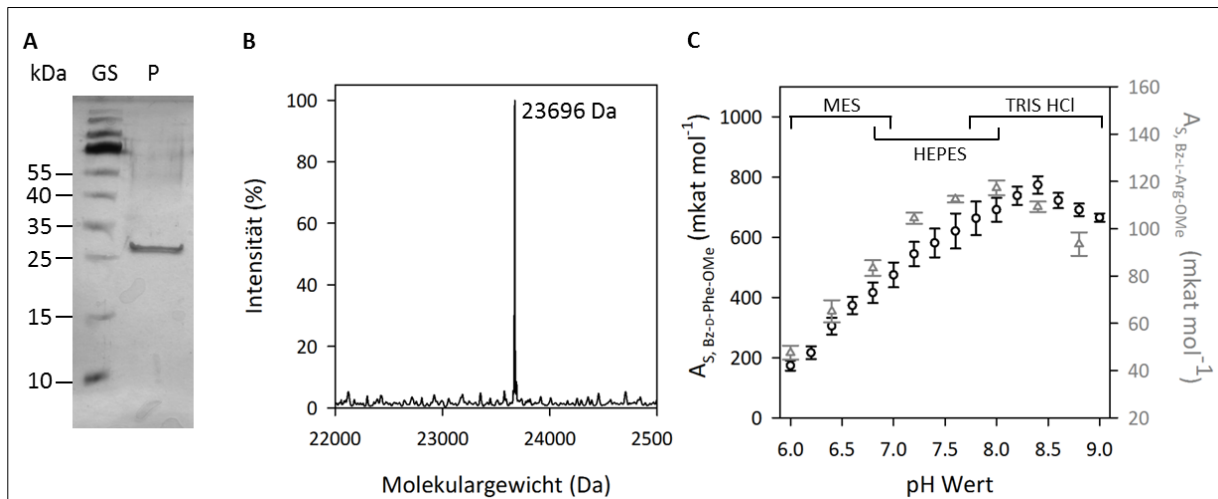
Da jedoch gleichzeitig eine Aktivität gegenüber den jeweiligen L-stereoisomeren Substraten nachgewiesen werden konnte, wurden beide Proteinvarianten in der Folge mit Hilfe von D/L-Aminosäuremethylestern untersucht. Die Auswahl der Aminosäuren erfolgte dabei analog der Substratauswahl zur Analyse von ADP/DHy, wobei auf die Untersuchung der Derivate mit der sauren Aminosäure D/L-Glutamat, der polaren Aminosäure D/L-Serin und der hydrophilen Aminosäure D/L-Asparagin verzichtet wurde, da die Ausgangsvariante SSAI-Trypsin gegenüber diesen Aminosäuren keine Reaktivität zeigte (**Kap. 3.1.1**). Das Profil der Akzeptanz beider Trypsinvarianten wies eine deutliche Reduktion und eine Verschiebung der proteolytische Aktivität im Vergleich zu SSAI-Trypsin auf (**Abb. 3.18**). So wurde im Fall von SSAI-GFTT-Trypsin Bz-D-Phe-OMe mit 573 mkat mol<sup>-1</sup> und im Fall von SSAI-ACMN-Trypsin Bz-D-Phe-OMe mit einer Aktivität von 85 mkat mol<sup>-1</sup> am besten akzeptiert. Zudem wiesen beide Proteinvarianten eine Verschiebung ihrer Spezifität zu aromatischen D/L-Aminosäuren auf. Dieser Effekt konnte ebenfalls bei der Charakterisierung von SSAI-PCPG-Trypsin beobachtet werden (Höger, 2014).



**Abb. 3.18 Charakterisierung der S<sub>1</sub>-Substratbindungsorte der Varianten SSAI-ACMN-Trypsin und SSAI-GFTT-Trypsin.** Im Balkendiagramm sind die spezifischen Aktivitäten A<sub>s</sub> von SSAI-GFTT-Trypsin (**A**) und SSAI-ACMN-Trypsin gegenüber verschiedenen Bz-L-Xaa-OMe (Hellgrau), Bz-D-Xaa-OMe (Dunkelgrau) und ergänzend Bz-Gly-OMe (Schwarz) dargestellt. /<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: Biosynthese und Reinigung der Varianten siehe **2.4.3** /100 mM HEPES (pH 7,8), 100 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 2 mM Bz-D/L-Xaa-OMe, 1–50 µM SSAI-GFTT/ACMN-Trypsin / Die Analyse der Reaktionen erfolgten mittels UPLC (variable Gradienten, 3 min, λ 254 nm). Die Messabweichung betrug < 10 %. /<sup>b</sup> 5 % (v/v) DMF wurden verwendet.

### 3.2.5 Charakterisierung von SSAI-GFTT-Trypsin

Aufgrund des Aktivitätsprofils und der höheren Aktivität von SSAI-GFTT-Trypsin im Vergleich zu SSAI-ACMN-Trypsin wurde diese Variante auf ihre kinetischen Eigenschaften untersucht. Nach Subklonierung und Biosynthese in *S. cerevisiae* erfolgte die Reinigung mittels Kationenaustauschchromatografie, anschließender vier- bis fünftägiger Aktivierung mittels Enterokinase und abschließender Anionenaustauschchromatografie (**Kap. 2.4.3**). Letztlich konnte SSAI-GFTT-Trypsin mit einer Ausbeute von 2,8 bis 3,3 mg/l erhalten werden.



**Abb. 3.19** Initiale Charakterisierung von SSAI-GFTT-Trypsin. Das Gen wurde wie beschrieben kloniert und in *S. cerevisiae* exprimiert (**Kap. 2.4.3**). Nach Reinigung, Aktivierung, Vereinigung und Konzentration der Protein-haltigen Fraktionen wurde die Probe sowohl gelelektrophoretisch (**A**) als auch massenspektrometrisch analysiert (**B**). Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Aktivität des Proteins gegenüber Bz-D-Phe-OMe (Schwarz) vom pH untersucht und ein Optimum zwischen 7,5 und 9 bestimmt. Vergleichend wurde die Aktivität gegenüber Bz-Arg-OMe untersucht (Hellgrau) (**C**). /Reaktionsbedingungen: 100 mM MES (pH 6,0–7,0), 100 mM HEPES (pH 6,5–8,5), 0,1 M Tris HCl (pH 7,5–9,0), 10 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 1 % (v/v) DMF, 2,2–50 μM SSAI-GFTT-Trypsin, 2 mM Bz-Arg-OMe / Bz-D-Phe-OMe, 30 °C / Elektropherogramm: 12,5 % (w/v) SDS-PAGE, Coomassie-Blau-Färbung, PageRuler Prestained Ladder (GS), konzentrierte Fraktionen (P) / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC/LC-MS (Gradient: 0 auf 40/100 % ACN, 3/20 min, λ 254 nm).

In der Folge wurde die Reinheit mittels Gelelektrophorese untersucht, wobei SSAI-GFTT-Trypsin in Analogie zur Gerüstvariante SSAI-Trypsin ein atypisches Laufverhalten im reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte und bei 26 kDa migrierte (**Abb. 3.19 A**). Zudem wurde die Identität des Proteins mittels LC-MS ( $m_{\text{ber}}$  23683 Da,  $m_{\text{best}}$  23696 Da) überprüft und bestätigt (**Abb. 3.19 B**). Des Weiteren wurde die pH-Abhängigkeit der Trypsinvariante mit den Substraten Bz-D-Phe-OMe und Bz-L-Arg-OMe untersucht (**Abb. 3.19 C**). Dabei wies das Enzym einen optimalen pH-Bereich von 7,5 bis 8,5 mit Bz-L-Arg-OMe auf, wobei das Optimum mit 116 mkat mol<sup>-1</sup> bei einem pH-Wert von 8,0 erreicht wurde. Wurde Bz-D-Phe-OMe als Substrat verwendet, so verschob sich das Aktivitätsoptimum mit einer spezifischen Aktivität von 782 mkat mol<sup>-1</sup> zu einem pH-Wert von 8,5 (**Abb. 3.19. B**). Die folgende kinetische Charakterisierung wurde zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit mit SSAI-Trypsin bei einem pH von 7,8 durchgeführt.

Folgend wurden die kinetischen Konstanten von SSAI-GFTT-Trypsin bestimmt (**Tab. 3.11**). Im Vergleich zur Hydrolyse von Bz-L-Arg-OMe durch SSAI-GFTT-Trypsin mit SSAI-Trypsin zeigte sich eine Verringerung des  $k_{\text{cat}}$ -Wertes um das 220-fache. Der  $K_{\text{M}}$ -Wert hingegen war um das 20-fache auf 1,17 mM erhöht. Bezüglich der  $k_{\text{cat}}$ -Werte von Substraten des Types Bz-D-Xaa-OMe weist Bz-D-Phe-OMe mit  $0,189 \text{ s}^{-1}$  höchsten  $k_{\text{cat}}$ -Wert auf, gefolgt von Bz-D-His-OMe mit  $0,029 \text{ s}^{-1}$ . Betrachtet man die  $K_{\text{M}}$ -Werte, so besitzen Bz-D-Phe-OMe und Bz-D-His-OMe mit  $K_{\text{M}}$ -Werten von 166  $\mu\text{M}$  bzw. 261  $\mu\text{M}$  die höchste Affinitäten der SSAI-GFTT-Variante.

Analog zu SSAI-Trypsin wurde zudem die hydrolytische Aktivität gegenüber Substratmimetika des Typs Bz-Gly-X untersucht<sup>9</sup>. Dabei ergab sich für Bz-Gly-OGp-Ester die höchste spezifische Aktivität ( $3,9 \text{ mkat mol}^{-1}$ ), während Thiophenylester ( $2,8 \text{ mkat mol}^{-1}$ ) und Phenylester ( $1,3 \text{ mkat mol}^{-1}$ ) im Vergleich langsamere bzw. im Fall von Benzoyl- und des Picolyesters gar keine Umsatzgeschwindigkeiten aufwiesen.

Daher wurde auf die Verwendung eines Substratmimetikums zur Untersuchung der  $S_{1'}$ -Substratbindungsortspezifität verzichtet. Zur Charakterisierung wurden Acyltransferreaktionen unter Verwendung von 2 mM Bz-D-Phe-OMe und den gleichen Aminosäureamiden, welche zuvor zur Charakterisierung von SSAI-Trypsin verwendet wurden, unter Standardbedingungen durchgeführt (Bedingungen s. Tab. 3.9). Hierbei wurde lediglich eine Akzeptanz von Met-NH<sub>2</sub> ( $14,4 \text{ M}^{-1}$ ), Leu-NH<sub>2</sub> ( $12,5 \text{ M}^{-1}$ ) und Phe-NH<sub>2</sub> ( $20,9 \text{ M}^{-1}$ ) festgestellt. Mit den übrigen Aminosäureamiden wurde keine messbare Produktbildung erreicht.

Bezüglich der Spaltung von Peptidbindungen wurden je 2 mM der Substrate Bz-AARAAG-OH und Bz-AAfAA-OH unter Standardmessbedingungen (0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) DMF) mit 50  $\mu\text{M}$  SSAI-GFTT-Trypsin über Nacht bei 30°C inkubiert. Eine Hydrolyse konnte mittels UPLC nicht detektiert werden.

**Tab. 3.11 Übersicht der abgeschätzten kinetischen Konstanten von SSAI-GFTT-Trypsin hydrolysierten Bz-D/L-Xaa-OMe Substraten.**

Substrat <sup>a</sup>	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{M}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
<b>Bz-D-Phe-OMe</b>	0,189	166,0	1140,0
<b>Bz-D-His-OMe</b>	0,029	261,0	111,0
<b>Bz-D-Tyr-OMe</b>	0,024	325,0	74,1
<b>Bz-D-Trp-OMe<sup>b</sup></b>	0,017	828,0	20,1
<b>Bz-D-Ala-OMe</b>	0,006	1234,0	5,4
<b>Bz-L-Arg-OMe</b>	0,002	1167,0	1,4

<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: 100 mM HEPES (pH 7,8), 100 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,05–10 mM Bz-D/L-Xaa-OMe, 2,2–50  $\mu\text{M}$  SSAI-GFTT-Trypsin / Die Analyse der Reaktionen erfolgten mittels UPLC (Gradient: 10 auf 50 % ACN, 3 min,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug < 15 %. / Die Auswertung der Sekundärgraphen sowie die daraus erfolgten Ableitungen der kinetischen Konstanten erfolgte nach verschiedenen Methoden. /<sup>b</sup> 5 % (v/v) DMF wurden verwendet.

<sup>9</sup> 0,1 M HEPES (pH 8,0), 0,1 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 2 mM Ester, 50  $\mu\text{M}$  SSAI-GFTT-Trypsin

# Diskussion

## 4.1 Studien zur alkalischen D-Peptidase

Die Alkalische D-Peptidase ist die bisher einzige bekannte Vertreterin der D-Aminosäure-spezifischen Serin-Endopeptidasen (Asano *et al.*, 1996). Identifiziert und isoliert wurde das Enzym mit Hilfe eines Trübungsassays, bei welchem die Hydrolyse von (D-Phe)<sub>4</sub> (trüb) in (D-Phe)<sub>2</sub> (klar) detektiert wurde. In anschließenden Studien wurde das Enzym als D-Phenylalanin-spezifische Serinprotease charakterisiert, welche zusätzlich eine  $\beta$ -Lactamase-Aktivität aufweist. Aufgrund der erstgenannten Eigenschaft entwickelte sich die ADP zu einem Modellenzym für die Synthese von D/L-Peptiden und -Proteinen. So wurde die ADP als Biokatalysator für die Synthese von (D-Phe)<sub>n</sub>-Oligopeptiden und ebenso für die Semisynthese von nativen *all*-L-Proteinen genutzt (Komeda & Asano, 1999; Wehofsky *et al.*, 2008).

Für eine breitere Anwendung des Enzyms als Biokatalysator in der Peptid- und Proteinsynthese ist jedoch eine erweiterte Kenntnis über die Substratbindungsortspezifität wünschenswert. Um diese zu erlangen und um gleichzeitig die Grundlage für die Identifizierung weiterer D-Aminosäure-spezifischer Enzyme zu schaffen, wurden in dieser Arbeit diverse Strategien für DD-Peptidasen etabliert. Hierfür wurde initial zur Bestimmung der S<sub>1</sub>-Substratbindungsortspezifität eine Bz-D/L-Xaa-OMe-Bibliothek synthetisiert. Die Aminosäureauswahl erfolgte so, dass möglichst viele verschiedene Eigenschaften der nativ auftretenden Aminosäureseitenkettenfunktionalitäten analysiert werden können. Als N-terminale Schutzgruppe wurde ein Benzoylrest gewählt. Dieser ermöglicht eine einfache Detektion der Edukte sowie Produkte und verhindert eine potentielle Oligomerisierung der verwendeten Ester, wie sie bei der Hydrolyse von NH<sub>2</sub>-D-Phe-OMe durch die ADP beobachtet wurden (Komeda & Asano, 1999). Hinsichtlich der Bestimmung des S'<sub>1</sub>-Substratbindungsortes wurde auf die Strategie von Modelacyltransferreaktionen zurückgegriffen. Hierbei wurden jedoch im Gegensatz zu vorherigen Studien keine Endausbeuten, sondern Partitionswerte als Maß für die Nukleophilspezifität und damit die Spezifität bestimmt (Wehofsky *et al.*, 2008).

Durch Analyse des S<sub>1</sub>-Substratbindungortes konnte zunächst die initiale Charakterisierung der D-Phenylspezifität der ADP bestätigt werden (Asano *et al.*, 1996). Diese Spezifität des Enzyms ist im K<sub>M</sub>-Wert reflektiert. Dieser liegt bei 57  $\mu$ M und befindet sich somit im Bereich der Primärspezifitäten der Gruppe der DD-Peptidasen (vgl. **Tab. 3.1.4** und **Kap. 3.1.5**). Abgesehen von dieser hohen hydrolytischen Aktivität gegenüber D-Phenylalanin weist die ADP zudem eine hohe hydrolytische Aktivität gegenüber der aromatischen Aminosäure Tyrosin auf, welche sich vermutlich durch die Substraterkennung des Enzyms erklären lässt. So ist es denkbar, dass die Substraterkennung im S<sub>1</sub>-Substratbindungsbereich durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen erfolgt, woraus eine dementsprechend hohe Aktivität gegenüber aromatischen Aminosäuren resultiert (McGaughey *et al.*, 1998). Neue Studien zur

Kristallstruktur der ADP belegen diese Annahme, wobei anzumerken ist, dass bei selbigen keine kokristallisierten Substrate genutzt wurden und die bisherigen Annahmen nur auf MD-Simulation und Dockingexperimenten basieren (Nakano *et al.*, 2015). Jedoch kann diese Erklärung nicht auf die verhältnismäßig hohe Aktivität gegenüber Bz-D-Met-OMe übertragen werden. Diese hydrolytische Aktivität der ADP war bisher unbekannt und deutet auf eine komplexere Substraterkennung innerhalb des  $S_1$ -Substratbindungsortes hin und lässt sich nach aktuellem Stand vermutlich nur durch die Bestimmung der Kristallstruktur und idealerweise durch Kokristallisation mit entsprechenden Substraten ergründen. Eine solche Struktur könnte außerdem dazu beitragen, die unspezifische Hydrolyse aller untersuchten D-Aminosäure-haltigen Substrate zu erklären (**Tab. 3.1**).

Mittels der verfügbaren Daten lässt sich spekulieren, dass diese Hydrolyse auf zwei Effekten beruhen könnte. Der erste ist in der Grundstruktur des Substrates begründet. So befindet sich in  $P_2$ -Position ein achiraler Benzoyl-Ring, welcher einen Phenylring eines D-Phenylalanins an Position  $P_2$  imitieren könnte. Dies ist insofern bedeutend, als dass das Enzym eine hohe Spezifität gegenüber (D-Phe)<sub>3+n</sub>-haltigen Substraten besitzt (Asano *et al.*, 1996). Dies deutet auf eine erweiterte Substraterkennung hin, welche durch Wechselwirkungen im  $S_{1-2}$ -Substratbindungsort bestimmt wird. Ein solcher Effekt wurde in dieser Enzymgruppe zudem beim ADP-ähnliche Enzym ADP2 aus *B. cereus*, welches eine ausgeprägte Aminodipeptidasereaktivität gegenüber (D-Phe)<sub>n</sub>-Substraten aufweist, gefunden (Komeda & Asano, 2003). Genauere Untersuchungen über den Einfluss des  $S_2$ -Substratbindungsortes beispielsweise durch Variation der N-terminalen Schutzgruppe wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt.

Daneben ist eine weitere Erklärung für die hohe Reaktivität gegenüber D-Aminosäure-haltigen Substraten der ADP denkbar. So konnte durch Lösen der Kristallstruktur des D-Phe-NH<sub>2</sub>-spezifischen Enzyms D-Aminosäure-Amidase aus *Ochrobactrum anthropi*, welches eine Sequenzidentität von 49 % zur ADP aufweist, gezeigt werden, dass einige DD-Peptidasen in der Lage sind, beide Stereoisomere (L-Phe-NH<sub>2</sub>, D-Phe-NH<sub>2</sub>) in ihrem  $S_1$ -Substratbindungsort zu koordinieren. Für eine katalysierte Hydrolyse der Amidbindung scheint dabei jedoch weniger die Koordination der Seitenkette, sondern jene der Aminogruppe der Spezifitätsvermittelnden Aminosäure entscheidend (Altschul *et al.*, 1990; Okazaki *et al.*, 2008b). Für eine ähnliche Koordination und Bindung innerhalb des  $S_1$ -Substratbindungsortes der ADP spräche die Diskriminierung gegenüber der Iminosäure D-Prolin. Zudem ließe sich hierdurch die verminderte Stereoselektivität erklären, welche sich im Umsatz einiger L-Aminosäuremethylester widerspiegelt.

Entgegen der verhältnismäßig hohen Stereoselektivität des  $S_1$ -Substratbindungsortes weist der  $S'$ -Substratbindungsort nur eine bedingte Stereoselektivität auf (**Tab. 3.2**). Besonders deutlich wird dies im Fall der untersuchten Acyltransferreaktionen von Bz-D-Phe-OMe und Aminosäureamiden als Nukleophilen, bei welchen sowohl D- als auch L-Phenylalaninamid am

besten akzeptiert wurden. Dieses Ergebnis ist insofern verwunderlich, da in früheren Studien L-Phe-NH<sub>2</sub> als ungeeignetes Nukleophil mit einer geringen Endausbeute beschrieben wurde (Wehofsky *et al.*, 2008). Eine Erklärung hierfür liefert der Vergleich der betrachteten Reaktionsbedingungen. So wurden für die Ermittlung der  $p^{-1}$  maximal 20 % des Acyldonors hydrolysiert, während bei früheren Studien in Endausbeutebestimmungen 100 % des Donors gespalten wurden. Bei letzterer Methodik besteht die Gefahr, dass Sekundärreaktionen mit zunehmendem Verbrauch des Acyldonors auftreten. So kommt es zum Beispiel im Fall der ADP nach vollständigem Verbrauch der Acyldonorkomponente zu einer Oligomerisierung. Ursächlich hierfür ist eine bisher unbekannte Aminosäuresamidase-Reaktivität der ADP gegenüber Bz-(D-Phe)<sub>n</sub>-D-Phe-NH<sub>2</sub> ( $n \geq 0$ ), welche sich letztlich in einer Oligomerisierung des eigentlichen Produktes Bz-D-Phe-D-Phe-NH<sub>2</sub> und somit einer niedrigeren Ausbeute für das erwartete Produkt widerspiegelt (Daten nicht gezeigt / interne Kommunikation mit Dr. N. Wehofsky).

Analysen von Acyltransferreaktionen mit Bz-Gly-OGp anstatt Bz-D-Phe-OMe als Acyldonorkomponente weisen auf eine deutliche Steigerung der  $p^{-1}$ -Werte hin. Diese ließen sich durch die Änderung des Acyldonors hin zu Bz-L-Glu-OGp weiter steigern, jedoch wurde aufgrund der erhöhten Instabilität desselbigen und aufgrund der vermuteten Eignung von Bz-Gly-OGp als Donorkomponente auf die Verwendung dieses Eduktes verzichtet (Wehofsky *et al.*, 2008). Die Acyltransferreaktionen mit Pentapeptiden als Acylakzeptoren zeigen auf, dass mit steigender Länge der Nukleophile der  $p^{-1}$  und damit die Ausbeute sinkt. Dies ist insofern außergewöhnlich, als dass die meisten klassischen Serinproteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin mit zunehmender Kettenlänge des Nukleophils erhöhte  $p^{-1}$  und damit zunehmende Ausbeuten aufweisen (Schellenberger *et al.*, 1994). Besonders deutlich wird dies im Fall von H-L/D-Phe-Ala-Ala-Ala-Gly-OH. Hier sinken die  $p^{-1}$  um etwa das 8- (bzw. 170-fache im Fall der Nutzung von Substratmimetika) im Vergleich zu den Aminosäureamiden (**Tab. 3.2**). Dieses Ergebnis deutet zudem auf einen zweiten Effekt hin. So steigt mit zunehmender Kettenlänge die Stereoselektivität des Enzyms, was auf einen L-Aminosäurespezifischen S<sub>2-4'</sub>-Substratbindungsort hinweist. Dieses Resultat ist insofern überraschend, als dass die ADP aufgrund ihrer Primärsequenz und der Eigenschaft,  $\beta$ -Lactame zu binden und zu hydrolysieren, den DD-Peptidasen zuzuordnen wäre und somit einen D-Aminosäurespezifischen S'-Substratbindungsort aufweisen sollte (Pratt, 2008). Dies deutet auf ein Alleinstellungsmerkmal der ADP hin, wobei zu bemerken ist, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt keine vergleichbaren Studien zu weiteren DD-Peptidasen bekannt sind. Zudem beweist die Akzeptanz von sterisch anspruchsvollen Nukleophilen, welche Arginin- und Phenylalaninreste an P<sub>1'</sub>- bzw. P<sub>2'</sub>-Position tragen, dass die ADP ein hervorragender Biokatalysator für die Anwendung zur N-terminalen Modifizierung von Peptiden und Proteinen in Zukunft sein kann (**Tab. 3.3**).



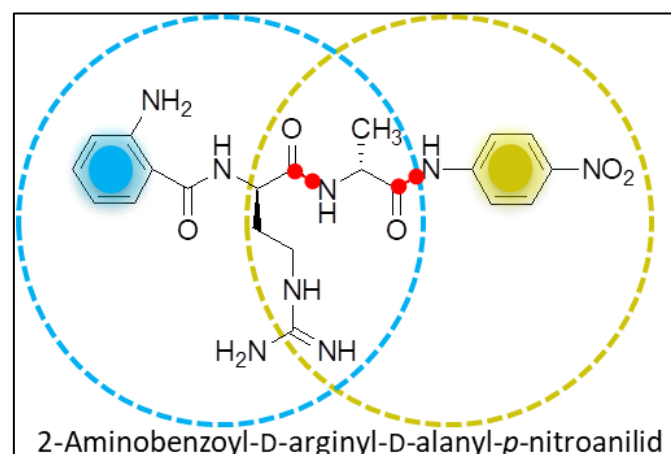
Aufgrund ihrer hydrolytischen Aktivitäten und ihres hohen synthetischen Potentials wurde die Sequenz der ADP als Matrize für bioinformatische Studien genutzt. Dass ein solcher Ansatz erfolgreich ist, zeigten bereits KOMEDA UND ASANO, welche die Primärsequenz der ADP in der Vergangenheit als Matrize für die Isolierung der ADP2 aus *B. cereus* nutzen (Komeda & Asano, 2003). Das Besondere hierbei ist, dass es sich um ein zu 87 % ADP-sequenzidentisches Enzym mit ähnlichen Eigenschaften aus einem anderen *B. cereus*-Substamm handelt. Analog zu dieser Studie, welche ein erster Hinweis auf eine evolutionäre Verbreitung ADP-ähnlicher Enzyme innerhalb der Gruppe der *Bacilli* ist, wurde in dieser Arbeit ein bioinformatischer Ansatz zur Identifikation ADP-ähnlicher Enzyme mit Hilfe des Programms eggNOG3.0 durchgeführt. Dieses Programm ermöglicht in verschiedenen Organismen auch außerhalb der *B. cereus*-Substämme nach ADP-homologen Enzymen zu screenen (Powell *et al.*, 2012). Dementsprechend wurden im Ergebnis nicht nur in *Bacilli*, sondern auch in diversen Gram-positiven wie auch Gram-negativen Organismen orthologe Enzyme identifiziert (**Abb. 3.2**). Damit stellt diese Studie hinsichtlich der späteren Isolierung der in dieser Arbeit beschriebenen DHys und den in weiteren Arbeiten untersuchten DHy-ähnlichen Enzymen (DHy2-4 aus *B. thuringiensis*) einen Pool an neuen Biokatalysatoren dar (Becker, 2013).

## 4.2 Verwendung von Abz-D-Arg-D-Ala-pNA als Screening-Substrat

Intern gequenchte fluorogene Substrate (IQFS), wie das in dieser Arbeit genutzte Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, gehören zu einer Gruppe von Verbindungen, welche unter anderem zum hoch sensitiven Nachweis proteolytischer Aktivität genutzt werden können (Gershkovich & Kholodovych, 1996). Voraussetzung hierfür ist eine für Proteasen sowohl spezifische als auch zugängliche Spaltstelle innerhalb dieses Substrates. Überdies wird ein Fluoreszenzfarbstoff und ein korrespondierender Quencher am *N*- bzw. *C*-Terminus des Peptides kombiniert, wodurch es in der Folge zur Fluoreszenzlöschung kommt.

Beim verwendeten IQFS wurden die proteolytischen Aktivitäten gegenüber D-Alanin und D-Arginin untersucht (Simon *et al.*, 2019). Dabei diene D-Alanin aufgrund der zu erwartenden proteolytischen Aktivität nativer PbP in den Biosyntheseorganismen als Positivkontrolle. Eine solche proteolytische Aktivität gegenüber D-Alanin konnte beispielsweise bereits für *E. coli* PbP5 mit Hilfe eines Aminosäure-Oxidase- und Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Assays unter Verwendung des Substrates Diacetyl-D-Lys-D-Ala-D-Ala nachgewiesen werden (Gutheil *et al.*, 2000). Die Aminosäure D-Arginin hingegen wurde hinsichtlich einer späteren optionalen Nutzung der identifizierten bzw. generierten Biokatalysatoren im Konzept der Substratmimetika-assistierten Fragmentsynthese unter Verwendung eines Guanidinophenylesters ausgewählt (Wehofsky *et al.*, 2008). Als Fluoreszenzdonor/Quencher-Paar (FQP) wurde 2-Aminobenzoessäure (Abz,  $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm  $\lambda_{\text{em}}$  420 nm) bzw. *p*-Nitroanilin (pNA,  $\lambda_{\text{Abs}}$  420 nm) gewählt (**Abb. 4.1**). Mit Hilfe dieser Kombination war es prinzipiell möglich,

eine Bibliothek oder einen Organismus in einem Screening-Schritt nach mindestens zwei verschiedenen, Protease-typischen Reaktivitäten zu durchmustern. Im Fall des genutzten IQFS kommt es bei einer D-Arginin-spezifischen Protease zur Freisetzung eines Fluoreszenzsignals bedingt durch Abz, während bei einer D-Alanin-spezifischen Protease zusätzlich ein Absorptionssignal durch freigesetztes *p*NA bei einer Wellenlänge von 405 nm generiert wird (**Abb. 3.1-2**). Eine ähnliche, wenn auch aufwändigere Detektion von D-Aminosäure-spezifischer proteolytischer Aktivität wird bereits in der Praxis mit IQFS-ähnlichen FRET-Substraten bzw. FRET-Bibliotheken durchgeführt. So können pathogene Organismen mit Hilfe von Fluorescein-/Dabcyl-markierten Dipeptiden entsprechend ihrer Spezifität identifiziert und klassifiziert werden (Kaman *et al.*, 2013b). Ähnlich dem IQFS wäre es hier ebenfalls möglich, weitere Aminosäuren und damit mögliche Spaltstellen innerhalb der Peptidsequenz zu positionieren, jedoch wäre der entsprechende analytische Aufwand um ein Vielfaches höher. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf den Einsatz weiterer potentieller Aminosäuren innerhalb der IQFS-Peptidsequenz verzichtet. Diese Entscheidung hatte Auswirkungen auf die Synthesestrategie. So wurde aus ökonomischen Gründen eine Synthese in Lösung anstatt am Harz durchgeführt, wie es bei *all*-L-Peptidyl-*cis/trans*-Isomerase-Substraten dieses Typs üblich ist (Zoldak *et al.*, 2009). Als entscheidend erwies sich hierbei die Verwendung einer *Boc*-Schutzgruppenstrategie gegenüber der sonst üblichen *Fmoc*-Schutzgruppenstrategie, da es bei Abspaltung letzterer schon bei geringsten Mengen von Wasser (Luft, Lösungsmittel) zur Freisetzung der *p*-Nitroanilingruppe kommt. Mit Hilfe dieser Synthesestrategie gelang es, eine Endausbeute von 34 % an reinem IQFS zu erhalten. Vergleichbare Synthesen von IQFS-Tetrapeptiden am Harz erreichen Ausbeuten von 10 bis 40 %, somit verlief die Synthese vergleichend gut bis sehr gut (Zoldak *et al.*, 2009).



**Abb. 4.1 Schema des intern gequenchten fluorogenen Substrates.** Dargestellt ist die Struktur des IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-*p*NA sowie die für Proteasen zugänglichen Spaltstellen (Rot). Zudem sind der Fluoreszenzdonor (2-Aminobenzoesäure/ blau), der Quencher (*p*-Nitroanilid/ Gelb) und schematisch zugehörige Försterradien (jeweils gestrichelte Linie) gekennzeichnet.

Für die Substanzklasse der IQFS hängt die Stärke des zu quenchenden Effekts vom FRET des verwendeten FQP ab (**Abb. 4.1**) (Förster, 1948). Im Fall der verwendeten fluoreszierenden 2-Aminobenzoessäure und des quenchenden *p*-Nitroanilins führt dieser FRET zu einer signifikanten Fluoreszenzlöschung (Filippova *et al.*, 1996). Dabei ist anzumerken, dass aufgrund der Försterradien  $R_0$  des verwendeten FQP die Peptidsequenz nicht auf zwei Aminosäuren begrenzt sein muss. So wird der Abstand durch die spektralen und photophysikalischen Eigenschaften der beiden gewählten Komponenten definiert (Wu & Brand, 1994). Hieraus leitet sich der  $R_0$ , jener Abstand zwischen dem FQP, bei welchem 50 % der Donorfluoreszenz gequencht wird, direkt ab. Nach dem Gesetz von FÖRSTER tritt ein effizienter FRET unterhalb des  $R_0$  auf, während Abstände oberhalb des  $R_0$  zu einer stetigen Abnahme dieses Effekts führen (Förster, 1948). Dementsprechend ist der  $R_0$  ein direktes Maß für den maximal effektiven Abstand eines FQP. Für das eingesetzte FQP Abz/*p*NA wurde ein maximaler Wert von 16 Å bestimmt (Zoldak *et al.*, 2009). Dies bedeutet, dass im Fall von unstrukturierten Peptidsubstraten die maximale Residuenanzahl zwischen den beiden Termini nach dem *Gaussian chain model* bei ungefähr 6 Aminosäuren liegt (Flory, 1989). Voraussetzung für diese Berechnung ist die Größe einer einzelnen Aminosäure von 3.8 Å. In der Praxis kann dieser Abstand aufgrund der Kettendynamik und durch diffusionsverstärkten FRET oder durch direkten Kontakt der Donorgruppe mit dem Quencher (statische Fluoreszenzlöschung) vergrößert werden. So wurde bereits ein Decapeptid mit 2-Aminobenzoessäure als Fluoreszenzdonor am *N*-Terminus und 4-Nitrotyrosin als Quencher erfolgreich synthetisiert und angewendet (Aumuller *et al.*, 2010).

Um die Eignung des IQFS für die Detektion *D*-Aminosäure-spezifischer Proteasen zu evaluieren, wurde in initialen Versuchen die Akzeptanz der ADP gegenüber Abz-*D*-Arg-*D*-Ala-*p*NA untersucht (**Abb. 3.1**). Resultierend hieraus konnte eine Spaltung des Substrates *C*-terminal des *D*-Alanins detektiert werden. Dies ist insofern überraschend, da dies nur bedingt aus dem Profil der hydrolytischen Aktivität des  $S_1$ -Substratbindungsortes ableitbar war. So wies die ADP eine hohe primäre Spezifität für aromatische Aminosäuren auf, was sich in einer um den Faktor 30 schnelleren Hydrolyse von Bz-*D*-Phe-OMe im Vergleich zu Bz-*D*-Ala-OMe widerspiegelte (**Kap. 3.1.1**). Des Weiteren konnte bisher lediglich eine geringe Akzeptanz von *p*-Nitroanilinsubstraten der ADP gezeigt werden (Asano *et al.*, 1996). So erfolgte die ADP-katalysierte Hydrolyse von *D*-Phe-*p*NA etwa 25-mal langsamer als jene von (*D*-Phe)<sub>4</sub> (Asano *et al.* 1996).

Dieses Ergebnis zeigt erstmals die Einsatzmöglichkeit des Substrates Abz-*D*-Arg-*D*-Ala-*p*NA zur Detektion der proteolytischen Aktivität von gereinigten Enzymen und weist gleichzeitig darauf hin, dass die Enzymgruppe der *DD*-Peptidasen, PbP und eventuell sogar  $\beta$ -Lactamasen einen Pool für *D*-Aminosäure-spezifische Peptidasen darstellt. Dies annehmend wurde in einem weiteren Schritt die Aktivität von Organismen-Überständen, welche solche Proteine putativ enthalten, gegenüber dem IQFS-Substrat untersucht.

Aufgrund des Ziels, eine D-Arginin-spezifische ADP-ähnliche Protease zu isolieren und infolge der durchgeführten bioinformatischen Studie (**Abb. 3.2**), wurde für die Untersuchungen zum Auftreten nativer proteolytischer Aktivität auf die Stämme *B. subtilis* und *B. thuringiensis* zurückgegriffen. Von Vorteil war die gute Verfügbarkeit beider Organismen sowie deren bekannte Genomsequenz, welche eine Zuordnung von Proteinsequenzen zu deren Genen ermöglicht (Reddy *et al.*, 2015). Dieses Ergebnis belegt, dass beide untersuchten Organismen eine hydrolytische Aktivität gegenüber dem IQFS aufweisen (**Abb. 3.3**), welche in Kontrast zu *B. thuringiensis* in *B. subtilis* ausschließlich auf eine D-Alanin-Reaktivität zurückzuführen ist. Ursächlich für eine solche hydrolytische Aaktivität können verschiedene Biokatalysatoren sein. So ist es denkbar, dass DD-Peptidasen (LMM-PbP) ähnlich der ADP diese Hydrolyse katalysieren. Wahrscheinlicher erscheint jedoch die Gruppe der ubiquitär in Bakterien vorkommenden HMM-PbP, welche eine Rolle in der Zellwandsynthese spielen und welche nachgewiesenermaßen eine C-terminale Hydrolyse aufweisen (Markiewicz *et al.*, 1982). So konnte in *Bacillus subtilis* eine D-Alaninaktivität für PbP5 und PbP4 gezeigt werden (Waxman & Strominger, 1979; Atrih *et al.*, 1999). Neben den DD-Peptidasen ist es zudem möglich, dass Autolysine oder DppA ein solches Proteolyse-Signal erzeugen können (Cheggour *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Letzt genanntes Protein ist dabei besonders interessant, da für dieses eine direkte hydrolytische Aktivität gegenüber D-Ala-pNA gezeigt werden konnte. Daneben konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DppA und Sporulationsprozessen von *Bacilli* nachgewiesen werden, was insofern interessant ist, da ein Großteil der Aktivität gegenüber dem IQFS erst in der späten stationären Phase auftritt (Daten nicht gezeigt) (Cheggour *et al.*, 2000).

Im Falle der Fluoreszenz des IQFS in *B. thuringiensis*-Zellfraktionen fällt die Ähnlichkeit der detektierten Reaktivitäten zu *B. subtilis* auf. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da sich *Bacilli*-Stämme wie *B. cereus* und *B. anthracis* in bis zu 75–80 % ihres Genoms und damit auch Proteoms ähneln (Ivanova *et al.*, 2003; Gohar *et al.*, 2005). In Homologie zu *B. subtilis* besitzt auch dieser Stamm Proteine, welche an der Zellwandsynthese- und Sporulationsprozessen beteiligt sind und eben jene D-Alanin-Aktivität verursacht haben könnten (Wang *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu *B. subtilis* weist *B. thuringiensis* im Kulturüberstand der späten stationären Phase oder eine neuartige Reaktivität gegenüber D-Arginin auf, was sich durch ein erhöhtes Fluoreszenz-Absorptionssignalverhältnis widerspiegelt (**Abb. 3.3**). Entsprechend der Eigenschaften der meisten bekannten DD-Peptidasen und ADP-ähnlicher Enzyme wurde bei der unbekannt Protease ebenfalls von einem erhöhten isoelektrischen Punkt ausgegangen und daher eine zweistufige Reinigung angestrebt (**Abb. 3.4**). Dabei wurde das IQFS erfolgreich zur Detektion der Aktivität und damit zur Isolation der D-stereospezifischen Hydrolase (dHy) eingesetzt. Das Protein selbst sowie seine Peptidsequenz konnte über seine Molekulargewicht von 37,6 kDa und gleichzeitige N-terminale Fragmentierung identifiziert werden (Speicher *et al.*, 2009). Dabei weist die dHy hohe Ähnlichkeiten zur Gruppe der DD-

Peptidasen auf, welche durch spezifische, konservierte Sequenzmotive und eine ähnliche Faltung gekennzeichnet sind. Im Allgemeinen wird dabei bei DD-Peptidasen das katalytische Zentrum durch eine katalytische Duade (SXXK-Motiv / DHy: SVTK) gebildet. Zudem treten ein YXN-Motiv (DHy: YSN) und das an der Ausbildung des Oxyanionlochs beteiligte HXGX-Motiv (DHy: HRGG) auf (Kelly & Kuzin, 1995; Fedarovich *et al.*, 2010; Dubois *et al.*, 2011). Aufgrund dieser Sequenzmotive konnte eine Zugehörigkeit der DHy zur Gruppe der DD-Peptidasen, welcher auch die ADP angehört, nachgewiesen werden. Daneben wurde während der Identifizierung der DHy mittels *N*-terminaler Fragmentierung ein im Vergleich zu Datenbank-Daten verkürzter *N*-Terminus von mindestens 38 und maximal 86 Aminosäuren festgestellt (Speicher *et al.*, 2009). Eine ähnliche Verkürzung konnte ebenfalls bei der Isolation der ADP, bei welcher ein 39 Aminosäuren langes „Signalpeptid“ vermutet wird und bei der DD-Peptidase aus *Streptomyces* R61, bei welcher ein C-terminales 26 Aminosäuren langes putatives Signalpeptid abgespalten wird, festgestellt werden (Fanuel *et al.*, 1994; Asano *et al.*, 1996). Eine Analyse mittels SignalP5.0 sagt eine leicht zur experimentell ermittelten Prozessierungsstelle verschobene Schnittstelle vorher. Jedoch ist die Länge des Signalpeptides ungewöhnlich lang, denn diese weisen in Bacilli normalerweise nur eine Länge von 18 bis 35 Aminosäuren auf (Simonen & Palva, 1993; Petersen *et al.*, 2011). Zusätzlich legen Strukturanalysen der *N*-terminalen Peptidsequenz mittels bioinformatischen Programmen wie JPred4 und PSIPRED den Schluss nahe, dass dieses Peptid einen multi-helicalen Bereich (Ile<sup>-33</sup> bis Tyr<sup>-16</sup>) bildet (Buchan *et al.*, 2013; Drozdetskiy *et al.*, 2015). Dies kann auf eine Verankerung des Proteins in der Zellwand durch transmembrane Helices hindeuten. Eine genaue Beantwortung dieser Frage und über die Länge des *N*-terminalen Peptids könnten in Zukunft durch Fusion an ein Reporterprotein im Rahmen eines Signalpeptid-*Swappings* geklärt werden (Jack *et al.*, 2004).

### 4.3 Charakterisierung der D-stereospezifischen Hydrolasen

Aufgrund der Identifizierung der DHy als D-Arginin-spezifische Hydrolase, mit weiteren Spezifitäten gegenüber D-Phenylalanin und D-Tryptophan haltigen Substraten, stellt selbige einen möglichen Biokatalysator für die Substratmimetika-vermittelte Semisynthese von *all*-L-Proteinen dar. Um das synthetische Potential der DHy zu evaluieren, wurde das kodierende Gen in der Folge kloniert, das Protein gereinigt und die Substratbindungsortspezifitäten anschließend analog zur ADP ermittelt. Hierfür wurde zunächst ein zweistufiges Reinigungsprotokoll etabliert, welches Ausbeuten von 19 bis 25 mg/L<sub>Kultur</sub> liefert. Im Vergleich zu ähnlichen Enzymen wie der ADP oder der D-Aminosäure-Amidase bedeutet diese Reinigungsstrategie eine Vereinfachung, da auf Fällungsschritte sowie Proteinfusions-transkripte verzichtet werden kann und die Proteinsynthese sowie Reinigung des Proteins

innerhalb von zwei Tagen abgeschlossen sind (Komeda & Asano, 1999; Komeda & Asano, 2000; Wehofsky *et al.*, 2008). Zudem konnte die in dieser Arbeit etablierte Reinigungsstrategie auf weitere Vertreter dieser Enzymklasse wie der dHy aus *B. cereus* (**Kap. 3.1.6**) und den dHy 2 bis 4 aus *B. thuringiensis* erfolgreich übertragen werden (Becker, 2013).

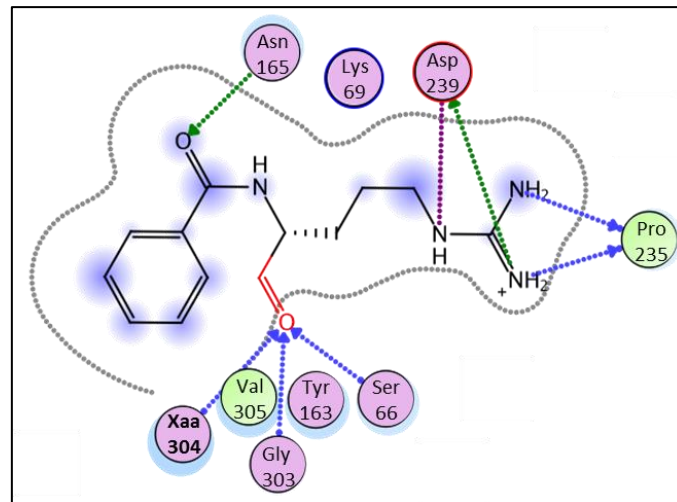
In der primären Charakterisierung des Enzyms wurde zunächst dessen pH-Abhängigkeit ermittelt, wobei der optimale Bereich bei den untersuchten Substraten sich zur ADP kaum unterscheidet (**Abb. 3.5**) (Asano *et al.*, 1996). Das  $S_1$ -Substratbindungsprofil der dHy weist erneut eine starke Ähnlichkeit zur ADP auf (**Tab. 3.1**). So hydrolisiert die dHy ebenfalls häufig beide Stereoisomere der untersuchten Substrate vom Typ Bz-D/L-Xaa-OMe (**Tab. 3.4**). Auffällig ist hierbei, dass die höchste verzeichnete hydrolytische Reaktivität nicht gegenüber dem ursprünglich *gescreenten* D-Arginin zu verzeichnen ist, sondern zumindest im Fall von Aminosäuremethylestern gegenüber aromatischen D-Aminosäuren wie D-Tryptophan, D-Tyrosin und D-Phenylalanin auftritt. Ein solches eher breites Spezifitätsprofil mit einer Spezifität gegenüber aromatischen Aminosäuren scheint für die Gruppe der DD-Peptidasen typisch zu sein. So wurde ein ähnliches Reaktivitätsprofil bereits für die D-Aminosäure-Amidase und die D-stereospezifische Aminopeptidase aus *O. anthropi* nachgewiesen (Asano *et al.*, 1989b; Komeda & Asano, 2000). Es ist jedoch anzumerken, dass in beiden Fällen eine Reaktivität gegenüber D-Arginin-haltigen Substraten nicht untersucht wurde und somit über eine Akzeptanz selbiger nur spekuliert werden kann. Zudem existiert mit der D-Aminosäure-Amidase aus *Brevibacterium iodinum* eine weitere, den DD-Peptidasen ähnliches Enzym, welche basische Aminosäure-Amide wie D-Arg-NH<sub>2</sub> und D-Lys-NH<sub>2</sub> mit vergleichsweise hohen Umsatzraten desaminieren kann (Komeda & Asano, 2008).

Eine Erklärung für die Spezifität der dHy bezüglich D-Arginin-haltiger Substrate liefern die katalytischen Parameter in Kombination mit der erhaltenen Kristallstruktur. So ist der  $K_M$  für Bz-D-Arg-OMe ca. 30-mal niedriger als für Bz-D-Phe-OMe (**Tab. 3.5**). Da im Fall von Estersubstraten die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  in der Regel den Schritt der Bildung des Acyl-Enzyms beschreibt (**Abb. 1.3**), lässt sich vermuten, dass die Ursache für diesen  $K_M$ -Wert entweder in der Affinität zum Substrates und/oder der Acylierung des Enzyms zu finden ist. In unserer der Kristallstruktur der dHy mit dem eingebundenen Bz-D-Arg-OMe und der so gezeigten ionischen Interaktion der Guanidino-Funktion mit der Säurefunktionalität des Asp<sup>239</sup> wird deutlich, dass die Ursache des niedrigen  $K_M$  mit hoher Wahrscheinlichkeit in der spezifischen Bindung des Substrates zu finden ist (**Abb. 3.7**). Anders verhält es sich im Fall der Geschwindigkeitskonstante  $k_{cat}$ , welche maßgeblich für das Profil der in dieser Arbeit bestimmten Hydrolyseaktivitäten ist. Bei diesen weist Bz-D-Phe-OMe einen um Faktor 3 erhöhten  $k_{cat}$  im Vergleich zu Bz-D-Arg-OMe auf. Da die Konstante bei Estersubstraten in der Regel die Deacylierung des Acyl-Enzym-Komplexes sowie die Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes widerspiegelt, bedeutet dies, dass im Fall von Bz-D-Arg-OMe vermutlich

eben diese Dissoziation für die Reduktion des  $k_{\text{cat}}$  verantwortlich ist. Ableitend aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass das Enzym vermutlich eine ausgeprägte Esterase-spezifität mit einer Präferenz für D-Arginin besitzt. Um eine endgültige Bestätigung des Einflusses der Bindung des Substrates auf den  $K_M$  bzw.  $k_{\text{cat}}$  zu erhalten, wäre jedoch noch weitere Messungen wie beispielsweise die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes notwendig (Zhao *et al.*, 1997).

Im zweiten Schritt der Charakterisierung der DHy wurden Acyltransferreaktionen zur Bestimmung der  $S'$ -Substratbindungsortspezifitäten durchgeführt (**Tab. 3.4**). Im Gegensatz zur ADP (**Tab 3.2**) weist das Enzym in seinem  $S_1'$ -Substratbindungsort eine klare Präferenz gegenüber D-Aminosäureamiden auf, was auf eine Zugehörigkeit der DHy zu den klassischen DD-Peptidasen hinweist (Pratt, 2008). Auffällig ist zudem, dass das Enzym eine Limitierung gegenüber der Kettenlänge im  $S'$ -Bindungsort aufweist. Dieses Ergebnis könnte auf eine Carboxypeptidaseaktivität hindeuten, wie sie für einige DD-Peptidasen und PbP beschrieben ist (Pratt, 2008; Vollmer *et al.*, 2008). Eine strukturelle Ursache für diesen Befund kann jedoch nicht abgeleitet werden. Die Kristallstruktur weist darauf hin, dass der  $S_1$ -Substratbindungsort in einer tiefen Spalte lokalisiert ist, was eine mögliche Erklärung liefern könnte, da eine Zugänglichkeit langkettiger Peptidsubstrate nicht gegeben ist (**Abb. 3.7**). Auf der anderen Seite kann diese strukturelle Besonderheit in Kombination mit der Substratlängenlimitierung auch auf eine Akzeptanz cyclischer Peptidsubstrate hindeuten (Longenecker *et al.*, 2006). Eine Spaltung solcher Substrate wie dem cyclischen Gramacidin S, welches das D-Arginin-ähnliche D-Ornithin in seiner Sequenz beinhaltet, konnte bereits für den Kulturüberstand von *B. brevis* gezeigt werden (Kurotsu *et al.*, 1982; Wallace, 1990). Um eine exaktere Aussage darüber zu treffen, müssten klassische Spaltungsexperimente mit Peptiden, welche in der Länge und Form variieren, durchgeführt werden. Hiermit sollte es möglich sein, eine Aussage zu treffen, ab welcher Kettenlänge die Substratbindung limitiert ist und ob die DHy eher cyclische oder lineare Peptidsubstrate präferiert.

Neben der Isolation der DHy aus *B. thuringiensis* wurde im Rahmen dieser Arbeit eine orthologe D-stereospezifische Hydrolase mittels Sequenzalignent in *B. cereus* identifiziert, isoliert und deren Gen kloniert (**Kap. 3.1.6**). Das dazugehörige Enzym weist eine sehr hohe Sequenzidentität zur DHy aus *B. thuringiensis* auf. So besitzen lediglich 16 der 342 Aminosäuren eine unterschiedliche Identität (**Abb. 3.9 / Abb. 4.2**). Diese Homologie spiegelt sich auch in den ermittelten kintische Konstanten wie auch den hydrolitischen Aktivitäten des Enzymes wider. So besitzen beide Enzyme eine hohe Spezifität für Bz-D-Arg-OMe und eine hohe hydrolytische Aktivität gegenüber aromatischen D-Aminosäuremethylester. Eine Besonderheit weist der Umsatz des IQFS auf (**Abb. 3.8**). Kam es im Fall der DHy aus *B. thuringiensis* zur proteolytischen Spaltung nach D-Arginin und der Bildung zweier proteolytisch stabiler Produkte, so entstehen im Fall der DHy aus *B. cereus* eine Vielzahl von Produkten.



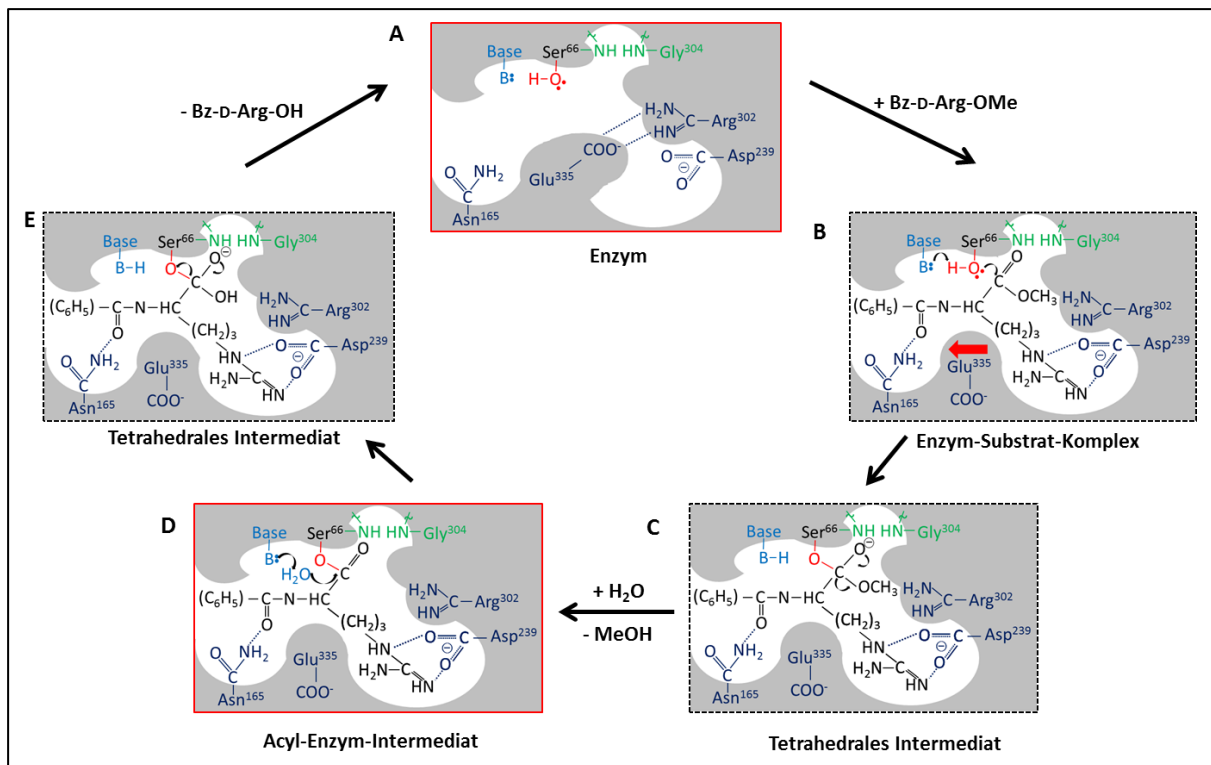
**Abb. 4.2 Ligand-Interaktions-Diagramm der dHy aus *B. thuringiensis* bzw. *B. cereus*.** Dargestellt sind die Aminosäuren in den S<sub>1</sub>-Bindungsorten der Enzyme sowie deren Interaktionen zum Substrat Bz-D-Arg-O-Ser<sup>66</sup> (Seitenketteninteraktion (Grün), Peptidrückgratinteraktion (Blau), ionische Wechselwirkung (Rot)) / Die Abbildung wurde mittels Schrödinger Maestro dargestellt. / Als Grundlage diente die Kristallstruktur der dHy mit kokristallisiertem Bz-D-Arg-OMe bzw. ein mit Phyre erstelltes Modell der dHy aus *B. cereus* (Kelley *et al.*, 2015)

Hierbei treten die einzelnen Produkte simultan auf, was bedeuten könnte, dass die dHy aus *B. cereus* eine weniger ausgeprägte Primärspezifität besitzt. Als ursächlich in der Sequenz könnte die Residuenposition 304 sein. Diese liegt in unmittelbarer Nähe zum HRG-Motiv, könnte an der Ausbildung des Oxyanionlochs beteiligt sein und somit unter Umständen die unterschiedliche Reaktivität bzw. Funktionalität erklären (**Abb. 4.2**). Auf eine Rückmutation wurde im Zuge dieser Arbeit aufgrund des eher limitierten synthetischen Potentials dieser D-stereospezifischen Hydrolasen verzichtet, welche effektiv nur für die Darstellung von Dipeptidamiden genutzt werden könnten. Jedoch liefert die Position 304 aufgrund dieser Erkenntnisse möglicherweise ein geeignetes Ziel für eine Optimierung von DD-Peptidasen im Allgemeinen im Konzept der Manipulierung und Optimierung von nicht-ribosomalen Peptid-synthesereaktionen. Abschließend lässt sich feststellen, dass die beiden isolierten D-stereospezifischen Hydrolasen neuartige Vertreter innerhalb der DD-Peptidasen darstellen, welche eine D-Argininspezifität aufweisen. Daneben sind sie erst die zweiten bekannten proteolytischen Enzyme neben den D-BAPAasen (Benzoyl-/D-arginin/p-nitroanilid-Hydro-lasen), welche eine Präferenz für D-Arginin und D-Arginin-haltige Substrate aufweisen (Gofshtein-Gandman *et al.*, 1988). Jedoch sind diese im Unterschied zur dHy im Zytoplasma lokalisiert und zudem mit einer molekularen Masse von 66 kDa etwa 30 kDa größer. Ebenso wie die meisten D-BAPAasen werden die dHys in Sporen-bildenden Organismen synthetisiert. Dies bedeutet, dass die dHys in Analogie zu den D-BAPAasen eine physiologische Funktion während der Sporulation erfüllen könnten (Boschwitz *et al.*, 1985). Ein Indiz hierfür ist das Auftreten der proteolytischen Aktivität der dHy, welche die Proteinbiosynthese widerspiegelt, in der späten stationären Wachstumsphase von



*B. thuringiensis*. Genaue Untersuchung hierüber könnten ihm Rahmen der Charakterisierung von Gen-Deletions-Varianten erhalten werden und in der Folge Rückschlüsse auf die biologische Funktion dieser Enzyme zulassen (Zellmeier *et al.*, 2003).

Neben der grundlegenden kinetischen Charakterisierung ist es im Rahmen dieser Arbeit auch gelungen, die Struktur der dHy aus *B. thuringiensis* mittels Kristallisation zu lösen (**Kap. 3.1.5**). Hierbei konnten zwei Strukturen des Enzyms erhalten werden, welche einen Vergleich der Koordination des aktiven Zentrums mit und ohne Substrate erlauben und damit Einblick in den Reaktionsmechanismus der Peptidase geben (**Abb. 3.6-7** und **4.2-3**). So lässt sich die Koordination der an der Katalyse beteiligten Reste im Grundzustand aus der Liganden-freien Struktur ableiten (**Abb. 4.3 A**). Dabei bilden Serin<sup>66</sup> und Lysin<sup>69</sup>, welche im SXXK-Motiv konserviert sind, sowie Tyrosin<sup>163</sup>, welches im YXN-Motiv vorliegt, das reaktive Zentrum (Kelly & Kuzin, 1995). Zudem lässt sich mit Hilfe der Strukturen der Klasse A- $\beta$ -Lactamase aus *S. aureus* und der DD-Peptidase aus *Streptomyces* R61 ableiten, dass das Oxyanionloch der Protease aus den Rückgrat-Stickstoff-Atomen des Serin<sup>66</sup> und Glycin<sup>304</sup> gebildet wird (**Abb. 4.3**) (Herzberg & Moulton, 1987; Murphy & Pratt, 1988). Darüber hinaus legen die Ergebnisse der Charakterisierung beider dHys sowie eine bioinformatische Liganden-Interaktions-Studie den Schluss nahe, dass sich die dem HRG-Motiv anschließende Aminosäure Glycin<sup>305</sup> ebenfalls an der Bildung des Oxyanionloch beteiligt (**Abb. 4.2**). Im Grundzustand scheint der Substratbindungsort zudem durch eine ionische Wechselwirkung zwischen Arginin<sup>302</sup> und Glutamat<sup>335</sup> stabilisiert zu werden. Durch die Bindung des Substrates Bz-D-Arg-OMe kommt es zu einem *induced fit* innerhalb des Enzyms, welches diese ionische Wechselwirkung zerstört und eine offene Form des Enzym erlaubt (**Abb. 4.3 B**, roter Pfeil) (Koshland, 1995). Ähnliche strukturelle Veränderungen konnten bereits bei einigen Vertretern der DD-Peptidasen/ $\beta$ -Lactamasen beobachtet werden. Diese können dabei vergleichsweise gering sein, wie die Relokation eines einzelnen Phenylalanins der D-Aminosäure-Amidase aus *O. anthropii* von der geschlossenen zur offenen Form zeigt (Okazaki *et al.*, 2008a). Es kann aber auch wie im Fall der Aminohexanolat-Dimer-Hydrolase eine größere Veränderung innerhalb der Proteinstruktur zu beobachten sein. So kommt es bei dieser  $\beta$ -Lactamase der Klasse C zur Verlagerung eines Tyrosins im aktiven Zentrum um 10,9 Å und der Bildung einer offenen Form des Enzyms, welches die Deacylierung durch Wasser erlaubt (Negoro *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist eine solche Bewegung im Molekül selbst ebenso für die ADP postuliert (Nakano *et al.*, 2015). Ein ähnlicher Effekt könnte auch im Fall der dHy stattfinden. Bei der Koordination des Substrates innerhalb des S<sub>1</sub>-Substratbindungsortes fällt auf, dass selbiges durch eine ionische Wechselwirkung zwischen Arginins<sup>302</sup> und Aspartats<sup>239</sup> orientiert wird.



**Abb. 4.3 Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der dHy.** Abgebildet ist der Grundzustand des Enzyms mit dem reaktiven Rest Ser<sup>66</sup> (Rot), der allgemeinen Base B (Hellblau) und dem Oxyanionloch, welches durch Ser<sup>66</sup> und Gly<sup>304</sup> gebildet wird (Grün). Zudem ist die ionische Wechselwirkung zwischen Arg<sup>302</sup> und Glu<sup>355</sup> verzeichnet (Dunkelblau) (A). Durch Bindung von Bz-D-Arg-OMe kommt es zu einem *induced fit* innerhalb des Enzyms (roter Pfeil). Es bildet sich eine ionischen Wechselwirkung zwischen Asp<sup>239</sup> und der Guanidinofunktion des Arginins sowie eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Asn<sup>165</sup> und dem Substrat aus. So erfolgt ein nukleophiler Angriff des Ser<sup>66</sup> auf den Carbonylkohlenstoff der Esterbindung (B). Nach Bildung eines tetrahedralen Intermediates (C) und Freisetzung von MeOH kommt es zu einem nukleophilen Angriff von Wasser (H<sub>2</sub>O) auf das Acyl-Enzym-Intermediat (D), in dessen Folge nach Bildung eines weiteren tetrahedralen Intermediat (E) die Freisetzung von Bz-D-Arg-OH und die Regeneration des Enzyms erfolgt. / Wechselwirkungen sind in blau-gestrichelten Linien, das Enzym als graue Fläche dargestellt. / Rot umrandete Schemazeichnungen repräsentieren die durch Kristallisation erhaltene Strukturen.

Dabei unterscheidet sich die Koordination von den meisten Arginin-spezifischen Serinproteasen wie Trypsin oder Kallikrein, welche normalerweise mit der Amidinofunktionalität des Arginins interagieren (Huber *et al.*, 1974; Skala *et al.*, 2014). Neben diesen beiden Enzym-Substrat-Interaktionen konnten aufgrund der limitierten Länge des Substrates keine weiteren nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu erwarten, dass es im Fall *N*-terminal verlängerter Peptidsubstrate zu einer Interaktion des Aspartats<sup>222</sup> mit dem Substrat kommt, wie es bereits bei der DD-Peptidase aus *Streptomyces* R61 gezeigt wurde (Hargis *et al.*, 2014a).

Während der Hydrolysereaktion kommt es nach der Bindung des Substrates zu einem nukleophilen Angriff des Serins<sup>66</sup> auf die zu spaltende Bindung. Hierbei entsteht ein erster tetrahedraler Übergangszustand (Abb. 4.3 C), aus welchem durch Abspaltung der Alkoholkomponente mit Hilfe von Wasser das Acylenzymintermediat (Abb. 4.3 D)

hervorgeht. In der Folge greift ein Wassermolekül, welches aufgrund der Interaktion mit der allgemeinen Base über eine erhöhte Nukleophilie verfügt, den Carbonylkohlenstoff an, wodurch sich das zweite tetrahedrale Intermediat bildet (**Abb. 4.3 E**). Aus diesem wird letztlich das Produkt freigesetzt, wodurch das Enzym regeneriert wird.

Durch Analyse der mit Bz-D-Arg-OMe kokristallisierten Struktur und Analyse der Bindungswinkel  $\alpha_{\text{cat}}$  und  $X_{\text{cat}}$  wird deutlich, dass diese Kristallstruktur vermutlich den Zustand des zweiten tetrahedralen Intermediates widerspiegelt (Buller & Townsend, 2013). Dies ist insofern interessant, als dass in DD-Peptidasen, wie auch  $\beta$ -Lactamasen, die Acylierung verstanden ist, jedoch die Deacylierung und insbesondere die Funktion und Art der allgemeinen Base umstritten sind. So existieren im Wesentlichen zwei Theorien, welche auf DD-Peptidasen wie die dHy übertragbar sind. In der Tyrosinat-Theorie wirkt das Tyrosin<sup>163</sup> der dHy in einem deprotoniertem Zustand als allgemeine Base und wird lediglich durch die protonierten Lysine Lys<sup>67</sup> und Lys<sup>315</sup> stabilisiert (Oefner *et al.*, 1990; Lobkovsky *et al.*, 1994; Dubus *et al.*, 1996; Hata *et al.*, 2006). Dabei dient hauptsächlich Lysin<sup>67</sup> zur Schaffung der elektrostatischen Umgebung im aktiven Zentrum (Monnaie *et al.*, 1994). Gemäß der Relais-theorie wirken Tyrosin<sup>163</sup> und Lysin<sup>67</sup> gemeinsam als allgemeine Base (Gherman *et al.*, 2004; Khaliullin *et al.*, 2010). In einem solchen Fall würde ein *Charge-Relais*-System zwischen der allgemeinen Base Lysin<sup>67</sup> und der allgemeinen Säure Tyrosin<sup>163</sup> gebildet werden, wobei zwischen beiden Residuen ein Proton transferiert werden würde (Pratt, 2008). Entsprechend der in dieser Arbeit gelösten Kristallstruktur lassen sich hierzu bedingt Rückschlüsse ziehen, jedoch sprechen aktuelle Studien für die Koordination der an der Katalyse beteiligten Reste eher für ein *Charge-Relais*-System. Hauptsächlich wird diese Annahme durch NMR- und QM/MM-Studien weiterer DD-Peptidasen gestützt, welche belegen, das Lysin<sup>67</sup> als allgemeine Base fungiert (Gherman *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009). Aufgrund der guten Kristallisierbarkeit und der hohen Spezifität der dHy stellt selbige jedoch ein nahezu ideales Modellsystem zur Beantwortung dieser Frage dar. Zudem könnte in Zukunft mit geeigneten Substraten mit dem Enzym auch die Rolle des Histidin<sup>301</sup> des HRG-Motives und des Glutamat<sup>240</sup>, welches nach neuesten Erkenntnissen ebenfalls an der Katalyse der Substrate beteiligt sein könnten, geklärt werden (Hargis *et al.*, 2014b; Nichols *et al.*, 2015).

#### 4.4 Studien zu SSAI-Trypsin

Im Zuge des Transfers von Bindungs- und Substratspezifitäten der katalytischen Domäne von Faktor Xa auf Trypsin wurden zunächst die Aminosäureresiduen Tyr<sup>99</sup> und Ala<sup>190</sup> sowie anschließend der Bereich des *Loops* 175 (Ser<sup>172</sup>-Ser<sup>173</sup>-Phe<sup>174</sup>-Ile<sup>175</sup>) von Faktor Xa auf Trypsin übertragen (Rauh *et al.*, 2002; Rauh *et al.*, 2004). Im so erstellten SSPI-Trypsin wurde in der Folge die Rolle der Aminosäure Phe<sup>174</sup> analysiert, wofür SSAI-Trypsin generiert wurde. Charakteristisch für diese Proteinvariante ist eine verminderte Affinität gegenüber Trypsin- und Faktor Xa-spezifischen Inhibitoren. So weist die inhibitorische Konstante eine Erhöhung

gegenüber dem Trypsin-spezifischen Inhibitor Benzamidin um das 11-fache und gegenüber dem Trypsin-/Faktor Xa-spezifischen Inhibitor  $N^{\alpha}$ -Tosylglycyl-3-amidino-D,L-phenylalanin-methylester um das 22-fache auf. Als vermeintlich ursächlich für diese veränderten Bindungseigenschaften wurden drei konformere Zustände (*down*, *up*, *super-up*) des *Loops* 175 in SSAI-Trypsin ausgemacht (**Abb. 1.5**) (Rauh *et al.*, 2004). Zudem lassen strukturelle Vergleiche der Strukturen von SSAI-Trypsin mit Thrombin oder auch der Aldolat-Reduktase, welche beide eine erhöhte Flexibilität in der Substratbindung aufweisen, den Schluss zu, dass SSAI-Trypsin über eine erhöhte Plastizität und Flexibilität und dementsprechend eine reduzierte Stringenz im  $S_1$ -Substratbindungsbereich verfügen sollte (Engh *et al.*, 1996; Urzhumtsev *et al.*, 1997). Da eine solche im *Loop* 175 variierte Trypsinvariante eine ideale Gerüstvariante für die gelenkte Evolution darstellen würde, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zuerst eine kinetische Charakterisierung. Dabei wurde der optimale pH-Bereich mit Hilfe des Standardsubstrats Bz-L-Arg-OMe ermittelt, bei welchem die höchste Aktivität im Bereich von pH 7,0 bis 8,5 bestimmt wurde, was im Bereich des Optimums für Trypsin liegt (Schwert & Takenaka, 1955).

Zur Untersuchung der katalytischen Eigenschaften von SSAI-Trypsin wurden in ihrer Art der chemischen Bindung und in der Abgangsgruppe variierende Substrate gewählt. Ursächlich hierfür ist, dass sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hydrolyse von Substraten bei den meisten Serinproteasen in Relation zur Natur der zu spaltenden Bindung im Substrat ändert. Aufgrund dessen können Rückschlüsse über die Substratbindung und die Teilreaktionen der Acylierung und Deacylierung gezogen werden (**Kap. 1.2**). Im Allgemeinen gilt dabei, dass die Acylierung für Säureamidbindungen in Substraten und die Deacylierung bei Esterbindungen in den zu spaltenden Substraten geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion sind (Fersht, 1985). Dementsprechend wurden zur Bestimmung der hydrolytischen Eigenschaften von SSAI-Trypsin die Substrate Bz-Ala-Ala-Arg-Ala-Ala-Gly < Bz-Arg-AMC < Bz-Arg-pNA < Bz-Arg-OMe (aufsteigend hinsichtlich ihrer Carbonylaktivität von Säureamidbindungs- zu Esterbindungscharakter) verwendet und vergleichend zu Wildtyp-Trypsin untersucht. Mittels der assoziierten Spezifitätskonstante ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ) wurde deutlich, dass diese infolge der Mutation des *Loops* 175 hin zu SSAI im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin einer generellen Verminderung unterlagen (**Tab. 3.7**). Dies ist ein Hinweis auf eine Beeinflussung des katalytisch relevanter Residuen im Enzym und geht mit der Beobachtung einher, dass lediglich die *down*-Konformation des *Loops* 175 zur Hydrolyse von Substraten befähigt ist (Rauh *et al.*, 2004; Tziridis *et al.*, 2014). Daneben konnte eine Verschiebung des Esterase-Amidase-Verhältnisses hin zur Esterase in der Aktivität des SSAI-Trypsins verzeichnet werden. Dies ist insofern interessant, als dass im Allgemeinen aufgrund mesomerer Effekte eine erhöhte Stabilität von Säureamidbindungen und damit eine reduzierte Amidaseaktivität auftritt und damit die meisten Serinproteasen eine höhere Esteraseaktivität aufweisen (Hedstrom, 2002b). Im Fall des verschobenen Esterase-Amidase-

Verhältnis zwischen Wildtyp-Trypsin und SSAI-Trypsin deutet dies darauf, dass die Positionierung des *Loops* 175 nicht nur die Bindung, sondern auch die Reaktivität des Enzyms beeinflusst könnte. Letzteres erscheint jedoch unwahrscheinlich, wie die Analyse der kinetischen Parameter der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte zeigt, welche im Fall von Estersubstraten (Bz-Arg-OMe) im  $k_{cat}$  und im Fall von Peptidsubstraten (Bz-AARAAG) im  $K_M$  widergespiegelt werden. So sind zwar beide Parameter im Fall von SSAI-Trypsin im Vergleich zu Wildtyptrypsin signifikant reduziert (**Tab. 3.7**). Da sie jedoch gleichzeitig die Bindung der Edukte bzw. Freisetzung der Produkte widerspiegeln, ist zu vermuten, dass der distale *Loop* 175 lediglich einen Einfluss auf die Bindung von Substraten besitzt. Diese Vermutung wird durch bisherige Studien zu SSAI-Trypsin, dessen Kristallstruktur sowie durch Untersuchungen zum Einfluss distaler *Loops* bei Trypsin-ähnlichen Enzymen verstärkt (Rauh *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005). Da ein Einfluss von an der Katalyse beteiligten Bereichen wie dem Oxyanionloch oder den Spezifität-determinierenden *Loops* 215 bzw. 226 nicht endgültig ausgeschlossen werden kann, ist eine Bestimmung der mikroskopischen Konstanten bzw. die Determination der Bindungsstärke erstrebenswert (Polgar, 1999; Velazquez-Campoy *et al.*, 2004; Aguirre *et al.*, 2015).

Aufgrund des erhöhten Esterase-Amidase-Verhältnisses, was eine gute Akzeptanz von Estersubstraten bzw. Substratmimetika und eine erhöhte Stabilität von synthetisierten Peptidketten verspricht, wurde eine Charakterisierung von SSAI-Trypsin durchgeführt. Hierfür wurde die Akzeptanz des  $S_1$ -Substratbindungsortes mit Hilfe einer Aminosäuremethylester-Bibliothek bestimmt. Dabei wies SSAI-Trypsin ähnlich dem Wildtyp-Trypsin die höchste hydrolytische Aktivität gegenüber Bz-L-Arg-OMe auf (Bergmann *et al.*, 1939). Abweichend zu anderen nativ vorkommenden Trypsinspezies zeigte SSAI-Trypsin jedoch eine gewisse Reaktivität gegenüber Alanin- bzw. aromatischen Aminosäuretragenden Substraten auf (**Tab. 3.8**). Diese Verschiebung des Aktivitätsprofils weist erneut auf einen Einfluss der SSAI-Substitution im *Loop* 175 auf die Koordination katalytisch relevanter Residuen hin. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Studien zur Aminosäureresidue Tyr<sup>172</sup> in anionischem Rattentrypsin (Hedstrom *et al.*, 1994a; Ma *et al.*, 2005). So konnte gezeigt werden, dass durch Variation dieser Aminosäure ein Einfluss auf die Stabilität des Substratbindungsortes bzw. im Fall der Substitutionsvariante Y172W eine Erhöhung der Spezifität (2–15 %) gegenüber Phenylalanin-haltigen Peptidsubstraten hervorgerufen wird (Hedstrom *et al.*, 1994a; Hedstrom *et al.*, 1994b). Schlussfolgernd für SSAI-Trypsin bedeutet dies, dass die Substitution der Position Tyrosin<sup>172</sup> hin zu Serin zu einer Destabilisierung des  $S_1$ -Substratbindungsortes führen könnte, was maßgeblich die drei konformereren Zustände (**Abb. 1.5**) und damit die erweiterte Aktivität hervorufen könnte (**Tab. 3.8**). Als weiteres Ergebnis der Bestimmung der  $S_1$ -Substratbindungsortspezifität ist zu bemerken, dass der Austausch in *Loop* 175 von SSAI-Trypsin zu keiner Veränderung der Stereospezifität führt. So weist SSAI-Trypsin wie die meisten nativen Trypsinspezies eine

strikte L-Stereospezifität auf. Studien, die eine vermeintliche Akzeptanz von D-Arginin bzw. D-Lysin postulieren (Purdie *et al.*, 1972), konnten im Rahmen dieser Arbeit weder mit SSAI-Trypsin, noch mit nativem anionischem Rattentrypsin II oder mit kationischem Rindertrypsin bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Ausnahme bildeten dabei Substrate des Typs Bz-D-Xaa-OGp, die aufgrund der inversen Einbindung hydrolytisch durch Trypsin gespalten werden konnten (Thormann *et al.*, 1999).

Neben der Akzeptanz von benzoylisierter Aminosäuremethylester wurde für SSAI-Trypsin auch die Reaktivität gegenüber Substratmimetika untersucht. Erwartungsgemäß wurden Aminosäureguanidinophenylester-Mimetika, bei welchen die Guanidinofunktion der Esterfunktion mit dem am Boden des  $S_1$ -Substratbindungsortes befindlichen Aspartat<sup>189</sup> interagiert, am besten umgesetzt (Thormann *et al.*, 1999). Allerdings tritt auch bei diesen Substraten im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin eine drastische Senkung der spezifischen Aktivität auf (Rall, 2004). Eine direkte Ursache hierfür ist aus den vorliegenden Daten nur schwer ableitbar, jedoch wäre zu spekulieren, dass die Flexibilität des SSAI-*Loops* unter Umständen die Guanidinophenylester vermittelte Relokation des Acylrestes verhindert (**Abb. 1.3**) (Rauh *et al.*, 2004).

Das Ergebnis der Modellacyltransferreaktionen von SSAI-Trypsin indiziert, dass die Substitution des *Loops* keinen Einfluss auf den  $S_1'$ -Substratbindungsort zeigt (Schellenberger *et al.*, 1994). Vielmehr weist SSAI-Trypsin die für Trypsin spezifische absteigende Akzeptanz der Aminosäuren im  $S_1'$ -Substratbindungsort von Methionin > Phenylalanin > Leucin auf. Für eine zukünftige Anwendung der Trypsinvariante in der Semisynthese muss jedoch noch die Modifizierung von langkettigen Peptiden und Proteinen optimiert werden. Ursächlich hierfür sind erste Studien zur N-terminalen Modifizierung mit Par10 und humanem Pin1 als Substrate, welche zeigten, dass SSAI-Trypsin trotz der verminderten Amidaseaktivität eine Reaktivität gegenüber intrinsischen Spaltstellen aufweist und nicht nur die gewünschte Ligation, sondern auch die Hydrolyse des Substrates sowie des Produktes katalysiert (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigt sich als limitierend, dass SSAI-Trypsin ähnlich zu anderen Trypsinvarianten räumlich kleine Aminosäuren an der  $P_2'$ - bzw.  $P_3'$ -Position des Nukleophils benötigt und das Substrat dementsprechend konstruiert werden muss (Daten nicht gezeigt; (Franke *et al.*, 2014)).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass SSAI-Trypsin über eine erhöhte Plastizität im  $S_1$ -Substratbindungsort verfügt. Dies spiegelt sich unter anderem durch die neuartige Akzeptanz gegenüber Aminosäuren wider, welche von Wildtyp-Trypsin nicht erkannt werden. Des Weiteren weist SSAI-Trypsin, vermutlich bedingt durch die strukturellen Änderungen im *Loop* 175, im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin eine deutlich verminderte Reaktivität gegenüber Trypsin-spezifischen Substraten auf. Auf der anderen Seite bedeutet dies jedoch auch, dass SSAI-Trypsin bei einer Biosynthese von aktiven Trypsinspezies in *E. coli* eine verminderte Toxizität aufweisen könnte. Da zudem der  $S_1'$ -

Substratbindungsort durch die Substitutionen im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin nicht verändert wird, stellt SSAI-Trypsin ein gutes Grundgerüst für die Evolution der Stereospezifität dar (Schellenberger *et al.*, 1994).

#### 4.5 Evolution der Stereospezifität

Im Gegensatz zu nativen DSP wie den Mitgliedern der DD-Peptidase-Enzymgruppe ist die Stereospezifität von L-Aminosäure-spezifischen Proteasen (LSP) und deren Ursache wenig untersucht (Pratt, 2008). So wurde nur ein Bruchteil dieser Enzyme überhaupt auf seine Akzeptanz gegenüber D-Aminosäure-haltigen Substraten getestet. Diese zeigten jedoch, dass LSP wie beispielsweise die Schweine-Elastase keine Reaktivität gegenüber solchen Substraten aufwies (Atlas & Berger, 1973). Es gibt aber auch einige Proteasen wie die L-Asparaginase aus *E. coli* oder das humane Thrombin, welche zumindest durch D-Aminosäure-haltige Peptidsubstrate inhibiert werden (Citri & Zyk, 1972; Bode *et al.*, 1989). Darüber hinaus gab es zudem Bestrebungen, eine Inversion der Stereospezifität von LSP durch artifizielle Modifikationen im  $S_1$ -Substratbindungsort zu erzeugen. Beispielhaft hierfür ist die Glykosylierung von Subtilisin mit dem Ergebnis einer erzeugten D,L-Aminosäure-stereoselektivität der generierten Varianten (Matsumoto *et al.*, 2001). All diesen Studien ist jedoch gemein, dass über die molekularen Ursachen für die Stereospezifität innerhalb der Enzyme nur spekuliert werden kann und somit ein allgemein gültiger Rückschluss auf LSP mit dem Resultat der gezielten Inversion der Stereospezifität nicht möglich ist. Es ist lediglich davon auszugehen, dass die Ursache für die Stereoselektivität wahrscheinlich im  $S_1$ -Substratbindungsort liegt. Da SSAI-Trypsin über eine erhöhte Plastizität in jenem Bindungsbereich verfügt, wurde es daher als Matrize für die Inversion der Stereospezifität einer LSP zur DSP genutzt. Überlegungen einer Strategie, bei welcher eine Übertragung der Spezifitäts-vermittelnden Bereiche von dHy im Rahmen von *staggered extension*-Prozessen (StEP) zur Bildung chimärer Enzyme führen, konnte aufgrund der geringen Sequenzidentität zwischen Trypsin und DSP nicht durchgeführt werden (Zhao *et al.*, 1998). Auf Grund zahlreicher Studien zur  $S_1$ -Bindungsortspezifität wurde eine gelenkte Mutagenese angestrebt, wobei auf das Einfügen ungezielter Mutationen wie durch *error prone*-PCR zur Detektion von Mutagenese-*Hotspots* verzichtet und ein semi-rationaler Ansatz angestrebt wurde, dessen Ziel die Mutagenese der Spezifitäts-vermittelnden *Loops* waren (**Abb. 3.11**) (Chen & Arnold, 1993; (Henke & Bornscheuer, 1999; Ma *et al.*, 2005). Als Strategie für die Darstellung der Trypsin Bibliotheken und damit auch die Auswahl der zu randomisierenden Bereiche wurde eine Kassettenmutagenese durchgeführt (Oliphant *et al.*, 1986). Dabei wurden jedoch Aminosäureresiduen, welche für die Stabilität bzw. die Katalyse essentiell sind, von der Randomisierung ausgeschlossen (Ma *et al.*, 2005; Radisky *et al.*, 2006). Des Weiteren sollte das IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-pNA, welches schon zur Identifizierung und

Isolation nativer D-stereospezifischer Enzyme genutzt wurde, zur Verwendung kommen, wobei zur Gewährleistung eines sukzessiven, evolutiven Screens einige Anpassungen bzw. Optimierungen im Vergleich zum Detektionssystem von DSP vorgenommen werden mussten (**Kap. 3.1.3 / 3.2.2**).

Grundlage hierfür sollte die Auswahl eines Biosynthesesystems bilden, welches eine schnelle und verhältnismäßig hohe Proteinbiosynthese bei korrekter Faltung der Zielproteine und hoher Robustheit gegenüber zytotoxischen Proteinvarianten aufweist. Daher wurde eine periplasmatische Synthesestrategie aktiver Trypsinvarianten in *E. coli* RG2 (DE3)pLysS angestrebt. Dieser Stamm trägt eine  $\Delta trxB/\Delta gor$ -Mutation, wodurch ein reduzierendes Milieu im Periplasma bewirkt wird und damit die generelle Grundlage für die korrekte Ausbildung der sechs intrinsischen Disulfidbrücken von Trypsin schafft (Bessette *et al.*, 1999). Um die Sekretion der synthetisierten Proteinvarianten in das Periplasma der Zellen zu erreichen, wurden diese als Proteinfusionstranskript mit einer *pelB*-Zielsequenz synthetisiert (**Abb. 3.12**) (Better *et al.*, 1988). Da das Screeningsubstrat Abz-D-Arg-D-Ala-pNA zum einen nicht membrangängig ist und zum anderen das Hintergrundsignal von Vollmedien eine Detektion auftretender Signale nicht erlaubt, wurden zusätzlich Anpassungen des Mediums und ein MTP-fähiger Aufschluss mittels Ultraschallbad etabliert (**Abb. 3.13 / 3.14 A**). Als Kontrolle konnte die Aktivität von in *E. coli* RG 2(DE3)pLysS-synthetisiertem SSAI-Trypsin mit dem IQFS nachgewiesen werden (**Abb. 3.13**). Dieser Nachweis ist wichtig, weil das *pelB*-Sekretionssignalpeptid lediglich einen Periplasmatransport des Proteins im ungefalteten Zustand über das Sec-Sekretionssystem erlaubt (Mergulhao *et al.*, 2005). Da jedoch enzymatische Aktivität von Trypsin nachgewiesen werden konnte (**Abb. 3.13 E**), kann von einer korrekten Faltung unter Ausbildung korrekter Disulfidbrücken im Periplasma ausgegangen werden. Um dies zu bestätigen und gleichzeitig alternative Transportwege wie das Tat-Sekretionssystem auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit dem SecY-Inhibitor Natriumazid sowie mit zwei  $\Delta Tat$ -*E. coli*-Stämmen durchgeführt (**Abb. 3.12 C-D**) (Sargent *et al.*, 1999; Blaudeck *et al.*, 2003). Hieraus resultierte im Fall der  $\Delta Tat$ -Varianten ein detektierbarer Proteintransport. Gleichzeitig wurde bei Inhibition des Sec-Sekretionsweges, bei welcher eine Akkumulation des Proteinfusionkonstruktes PelB-Trypsin im Zytoplasma stattfand, kein Transport festgestellt. Diese beiden Befunde belegen, dass die Faltung von Trypsin erst im Periplasma stattfindet.

In der Folge wurde das Biosynthesesystem zur Invertierung der Stereospezifität von Proteasen auf seine Robustheit hin analysiert. Dabei wurde zunächst die Hintergrundaktivität von *E. coli* RG 2(DE3)pLysS ohne Plasmid gegenüber dem Screening-Substrat untersucht. Hierbei konnte eine Aktivität von im Periplasma lokalisierten DSP festgestellt werden (**Abb. 3.14**). Ursächlich für diese gegen D-Alanin gerichtete Reaktivität sind vermutlich *E. coli*-eigene PbP. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Proteasen PbP4,



PbP5, PbP6 und DacD eine hydrolytische Aktivität gegenüber D-Aminosäure- und insbesondere D-Alanin-haltigen Substraten aufweisen (Ghosh *et al.*, 2008).

Bezüglich dieser Hintergrundaktivität zeigte sich im Fall der Anwendung des Screening-Systems mit dHy als Matritze, dass die Abundanz der *E. coli* eigener DSP, bei ausreichender hydrolytischer Aktivität der zu screenenden Proteasen, keinen Einfluss auf die Detektion proteolytischer Aktivität hat (**Abb. 3.15**). Damit lässt sich feststellen, dass das entwickelte System eine Möglichkeit zur Optimierung von DSP hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie Aminosäurespezifität, Temperaturabhängigkeit oder Lösungsmittelstabilität darstellen sollte. Im Fall von LSP wie dem SSAI-Trypsin, bei welchen eine Inversion der Stereospezifität im Fokus steht, werden jedoch Limitationen des entwickelten Screening-Systems deutlich. So wurde aufgrund der nicht vorhandenen initialen Akzeptanz von D-Arginin- bzw. D-Alanin-haltigen Proteasesubstraten durch SSAI-Trypsin und eines vermutlich zu niedrigen Biosyntheseniveaus die Inkubationszeit zur Detektion der proteolytischen Aktivität verlängert. Als Konsequenz hieraus resultierte eine durch das Biosynthesystem bedingte erhöhte Hintergrundaktivität, welche in einer fehleranfälligen Linearisierung der Screening-Resultate mündete (**Kap. 3.2.3**). In Kombination mit der natürlichen Mutationsrate von *E. coli* sowie toxischer Biosyntheseprodukte hatte dies zur Folge, dass ein gewisser Anteil an falsch-positiven Resultaten verzeichnet wurde (Sniegowski *et al.*, 1997). Besonders deutlich wurde dies im Fall der Studien zum *Loop 226*, bei welchem eine hohe Falsch-Positiv-Quote verzeichnet wurde. Um zumindest den Effekt der natürlichen Mutationen im Biosynthesystem abzumildern, wurde deshalb ein zusätzlicher DNA-Präparationsschritt vor der Einzelvariantenanalyse durchgeführt.

Als Ergebnis des Screenings von *Loop 189* konnten letztendlich 5 putativ D-Aminosäure-akzeptierende Trypsinvarianten erhalten werden. Auffällig hierbei war, dass sämtliche dieser Varianten entgegen der ursprünglichen Synthesestrategie der Bibliothek 189 eine Mutation des Cys<sup>191</sup> aufwiesen. Da zudem 3 der 5 Varianten eine Aktivität gegenüber D-Aminosäure-haltigen Substraten aufwiesen, lässt dies den Schluss zu, dass die intrinsische Disulfidbrücke zwischen Cys<sup>191</sup> und Cys<sup>220</sup> an der Ausbildung der Stereospezifität beteiligt sein könnte. Auf der anderen Seite erklärt das Fehlen der Disulfidbrücke außerdem die Verschiebung der hydrolytischen Aktivität der erhaltenen Varianten in Richtung aromatischer Aminosäuren. So ist bekannt, dass im Fall der Eliminierung der intrinsischen Disulfidbrücke bei Wildtyp-Trypsin eine signifikant erhöhte Akzeptanz von Chymotrypsin-spezifischen Substraten auftritt (Varallyay *et al.*, 1997). Ebenso ist bei dieser so entstandenen Trypsinvariante eine Verengung des pH-Optimums festgestellt worden, wie es auch bei SSAI-GFTT-Trypsin beobachtet wurde (**Abb. 3.19**) (Varallyay *et al.*, 1997). Daneben zeigt die Analyse der erhaltenen Varianten, dass lediglich 3 von 5 Varianten eine Reaktivität gegenüber D-Aminosäuren aufwiesen, was erneut ein Hinweis darauf ist, dass die Hintergrundaktivität der für die Biosynthese verwendeten *E. coli*-Zellen falsch-positive Varianten erzeugen kann. In

der Folge wurden die best-akzeptierenden Trypsinvarianten SSAI-ACMN-Trypsin und SSAI-GFTT-Trypsin hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber D-Aminosäure-haltigen Estersubstraten untersucht. Hierbei konnte eine hohe Akzeptanz gegenüber aromatischen D,L-Aminosäuren sowie gegenüber D-Alanin, welches im verwendeten IQFS auftritt und L-Arginin festgestellt werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das etablierte Screening-System funktional ist, dass es jedoch auch weiterer Modifizierungen in zukünftigen Screeningzyklen bedarf, bei welchen die Eliminierung der ursprünglichen Reaktivität gegenüber L-Arginin und die drastisch reduzierte hydrolytische Aktivität, welche sich in den reduzierten  $k_{cat}$ -Werten der Variante SSAI-GFTT-Trypsin widerspiegelt, im Fokus stehen sollte.

Rückblickend wird somit deutlich, dass SSAI-Trypsin als Ausgangsvariante zur gelenkten Evolution unter Nutzung des entwickelten Screening-Systems zur Inversion der Stereospezifität geeignet ist. Eine Übertragung der erhaltenen Variante SSAI-GFTT-Trypsin auf Wildtyp-GFTT-Trypsin ergab, dass die Austausch nur in Kombination mit SSAI eine hydrolytische D-stereospezifische Aktivität ermöglichen (Armbrust, 2014). Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass SSAI-Trypsin als initiales Ausgangskonstrukt eine L-Aminosäurespezifische Enzymvariante mit einer vergleichsweise niedrigen hydrolytischen Aktivität ist (**Tab. 3.8**). Zudem entstand in Kombination mit der niedrigen Biosyntheserate und dem *E. coli*-Biosynthesesystem, in welchem native DSP nachweisbar waren, ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis (**Tab. 3.17**). Um dies zu umgehen war es angedacht, einen Sekundär-Screen zu etablieren. Dabei gestaltete es sich als Herausforderung, die während des Screenings generierten SSAI-Trypsinvarianten mittels Zentrifugation von diesen DSP zu separieren. Selbst eine Reinigung von SSAI-Trypsin in größeren Maßstab unter Verwendung von *E. coli* RG 2(DE3)pLysS als Biosynthesestamm in Verbindung mit der Trypsinreinigungsstrategie für Hefen erlaubte es nicht, die DSP vollständig von den aktiven Trypsinspezies zu trennen und erzwang eine Adaption des Sekundär-Screens (Daten nicht gezeigt). So wurde zur Validierung der erhaltenen putativen D-Aminosäure-spezifischen Trypsinvarianten mit Hilfe von Aminosäuremethylestern eine Subklonierung der erhaltenen Sequenz in das pST/pYT-System für die Nutzung in einem Hefebiosynthesesystem notwendig (Hedstrom *et al.*, 1992). Dieses System hat nicht nur den Vorteil, dass eine unabhängige Bestätigung der proteolytischen Aktivität der erhaltenen Varianten gegenüber dem IQFS stattfindet, sondern erlaubt aufgrund der höheren Biosyntheserate auch eine Charakterisierung mit weiteren Substraten. Überdies erwies sich dieses System als vorteilhaft, da *S. cerevisiae* keine messbare Aktivität von DSP im Kulturüberstand aufweisen (Daten nicht gezeigt). Aus ökonomischer Sicht steht der Einführung eines Primär-Screens auf Basis eines Hefebiosynthesesystems jedoch die deutliche Erhöhung der Kosten gegenüber. Dies folgt aus der Anschaffung von Materialien und der zusätzlichen Arbeitszeit für die Prozesse der Reklonierung und Biosynthese, der Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen und dem Schritt der Aktivierung durch Enterokinase (Kunitz, 1939).

Bezüglich weiterer zukünftiger Anwendungen lässt sich vermuten, dass das entwickelte Modellsystem zum Screening D-stereospezifischer Proteasen sehr gut geeignet sein sollte, um sowohl Proteineigenschaften als auch die Spezifität von dHys bzw. PbP durch gelenkte Evolution zu modifizieren. Jedoch ist es hierbei ratsam, evolutiv geeignete Residuen in den jeweiligen dSP mittels semi-rationalen Ansätzen sowie bioinformatischen Studien zu ermitteln und somit die Anzahl zu screenender Varianten zu minimieren (Lutz, 2010). In diesem Fall wäre das hier entwickelte System mit seinem doch eher geringem Durchsatz an Varianten im Rahmen eines *low-throughput* Screenings zweckmäßig (Hertzberg & Pope, 2000). Zur Erhöhung der zu screenenden Varianten wären Adaptionen im Modellsystem ratsam. So böten eukaryotische Systeme wie *Pichia pastoris* oder *Kluyveromyces lactis* die Möglichkeit einer Biosynthese von Proteinvarianten in Abwesenheit nativer dSP in der Regel verbunden mit deutlich höheren Syntheseraten (van den Berg *et al.*, 1990; Cereghino *et al.*, 2002). Ein weiterer Vorteil solcher Systeme wäre, dass aufgrund der Sekretion der Proteine ein Screening auf Agarplatten bzw. mittels Agaroseüberschichtungs-Assays möglich wäre (Green & Sambrook, 2012). Diese Adaptionen sollten eine Vervielfachung der zu screenenden Varianten von aktuell 0,1 bis 0,3 Mio. Proteinvarianten je Bibliothek ermöglichen. Da Hefen zudem in ihrem Genom lediglich über D-Aminosäure-Oxidasen verfügen, wäre somit eine Übertragung des Screening-Systems im Rahmen eines Hefebiosynthesystems oder sogar eine Anwendung im Rahmen eines „Hefe-Displays“ für eine solche gelenkte Evolution denkbar (Boder & Wittrup, 1997; Caligiuri *et al.*, 2006). Ein weiterer Vorteil wäre zudem, dass auf eine mathematische Linearisierung (**Kap. 3.2.3**) sowie auf vereinfachende Annahmen wie ein ähnliches Biosyntheseniveau oder eine ähnliche Faltung und Toxizität verzichtet werden könnte. Als nachteilig würde sich in einem Hefesystem auswirken, dass die Bedingungen für eine direkte Aktivitätsbestimmung der Varianten optimiert werden müssten.

Im Allgemeinen gestaltet sich eine Einordnung dieser Ergebnisse als relativ schwierig. Es wurden bisher keine Studien zur Inversion der Stereospezifität von Proteasen durchgeführt, jedoch weisen Studien innerhalb der Gruppe der Hydrolasen, zu welcher auch Trypsin zählt, teilweise auf ähnliche Resultate in der Beeinflussung der Stereospezifität durch den S<sub>1</sub>-Substratbindungstaschenbereich hin. So konnte die Stereoselektivität der Epoxidhydrolase aus Limone durch iterative Sättigungsmutagenese mittels NNK-Primern in eben diesem Bereich verbessert werden (Zheng & Reetz, 2010). Ähnliche Studien zur Selektivität der Lipase B aus *Candida antarctica* legen zudem den Schluss nahe, dass auch die Substratbindungstasche der Abgangsgruppe an der Bindung beteiligt sein könnte (Wu *et al.*, 2013). Eine Involvierung selbiger könnte mit dem in dieser Arbeit entwickelten Screening-System, welches idealerweise auf Hefen übertragen wird, untersucht werden und nach anschließender Optimierung die so erhaltene Variante für die Modifikation von Proteinen und Peptiden genutzt werden.

# Zusammenfassung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Etablierung eines Screening-Systems zur Identifizierung und Charakterisierung neuartiger D-Aminosäure-spezifischer Proteasen bzw. -varianten, um potentielle Biokatalysatoren für die Semisynthese von Peptiden und Proteinen zu identifizieren. Dafür wurden eine Aminosäurebenzylester-Bibliothek, eine Substratmimetikabibliothek, eine Pentapeptidbibliothek sowie das für das Screening vorgesehene Substrat Abz-D-Arg-D-Ala-pNA chemisch synthetisiert.

Diese wurden in der Folge genutzt, um initial die einzig bekannte D-Aminosäure-spezifische Protease ADP zu charakterisieren. Dabei wurde bestätigt, dass die ADP in ihrer  $S_1$ -Substratbindungstasche über eine hohe Spezifität gegenüber aromatischen D-Aminosäuren und insbesondere D-Phenylalanin sowie für Substratmimetika des Guanidinophenolestertyps verfügt. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Enzym eine ausgeprägte Esterasefunktion, welche sich in der Akzeptanz nicht aromatischer D-Aminosäuremethylester verfügt sowie auch eine Amidasefunktion aufweist, welche sich durch Hydrolyse von Bz-(D-Phe)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> widerspiegelt. Acyltransferreaktionen belegten, dass das Enzym im  $S_{1-3}'$ -Substratbindungsort mit zunehmender Größe des Nukleophils eine durch den  $p^1$ -Wert wiedergespiegelte Spezifität gegenüber größeren L-Aminosäuren, wie L-Phenylalanin und L-Arginin, besitzt. Damit ist die ADP ein neuartiger Vertreter einer DL-Peptidase innerhalb der Familie der  $\beta$ -Lactamasen.

Im Rahmen einer bioinformatischen Studie wurden putativ ADP-ähnliche Enzyme vorhergesagt. Daraufhin konnte mit Hilfe des IQFS eine D-Arginin-spezifische D-stereospezifische Hydrolase (dHy) identifiziert und nativ isoliert werden. Studien zur  $S_1$ -Substratbindungstaschenspezifität dieses Enzyms wiesen analog der ADP auch auf eine Reaktivität gegenüber aromatischen D-Aminosäuremethylestern auf. Im Gegensatz zur ADP zeigt der  $S'$ -Substratbindungsbereich der dHy eine klare Reaktivität gegenüber D-Aminosäuren und eine Substratlängenlimitierung.

Durch das Vorhandensein der Sequenzmotive YXN, HRG und der katalytische Duade SXXK sowie die in dieser Arbeit gelöste Kristallstruktur des Enzyms lässt sich die dHy als DD-Peptidase einordnen. In weiterführenden *Soaking*-Experimenten gelang es zudem, eine Kristallstruktur zu lösen, welche kovalent das Substrat Bz-D-Arg-OMe gebunden hat. Diese ermöglichte die Identifizierung des Asp<sup>239</sup>, welches sich am Boden der Substratbindungs-ortes befindet und die Koordination der basischen Aminosäureseitenkette koordiniert. Zudem gewährt dieser Enzym-Substrat-Komplex einen Einblick in die Reaktion von DD-Peptidasen und könnte in der Zukunft zur Klärung offener Fragen in Bezug auf die Rolle der allgemeinen Base in der  $\beta$ -Lactamase-Familie beitragen.

Als weitere Strategie zur Generierung neuartiger Biokatalysatoren wurde die Evolution der Stereospezifität eines L-Aminosäure-spezifischen Enzyms verfolgt. Als Ausgangskonstrukt für diesen Ansatz wurde SSAI-Trypsin gewählt. Das Enzym wurde initial auf seine katalytischen Eigenschaften sowie auf sein synthetisches Potential hin untersucht. SSAI-Trypsin ist ähnlich anderer Trypsinspezies mit einer hohen Spezifität für L-Arginin strikt L-Aminosäurespezifisch. Allerdings konnte durch Variation Arginin-haltiger Substrate ein verschobenes Amidase-Esterase-Verhältnis der Variante festgestellt werden. In der Folge wurde durch Acyltransferexperimente festgestellt, dass der S'-Substratbindungsort dem von Wildtyp-Trypsin ähnelt und das SSAI-Trypsin eine verminderte hydrolytische Aktivität gegenüber Substratmimetika aufweist. Über die Ursache hierfür kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nur spekuliert werden.

Um ein *enzyme engineering* der Stereospezifität von SSAI-Trypsin durchzuführen, wurde ein Screening-System etabliert, welches eine einfache Detektion der hydrolytischen Aktivität bei einer schnellen Biosynthese und einer gut zu *screenenden* Anzahl an Proteinvarianten ermöglicht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Trypsin-Varianten bedingt durch die PelB-Zielsequenz über den *Sec*-Transportweg ins Periplasma transloziert werden. Durch Randomisierung der in Trypsin an der Substraterkennung beteiligten *Loops* 192, 215 und 226 wurden in der Folge drei Enzymvariantenbibliotheken generiert und mit Hilfe des IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-pNA *gescreent*. Dabei führte lediglich die Bibliothek 189 zur Isolation von fünf putativ D-Aminosäure-spezifischen Trypsinvarianten. Dabei konnten mit SSAI-GFTT-Trypsin und SSAI-ACMN-Trypsin zwei D-Aminosäure-spezifische Trypsinvarianten identifiziert werden, welche jedoch nach wie vor eine vorhandene Reaktivität gegenüber L-Arginin und zudem eine verschobene Spezifität hin zu aromatischen L/D-Aminosäuremethylestern in Kombination mit niedrigen Hydrolysegeschwindigkeiten aufweisen.

Abschließend lässt sich somit feststellen, dass durch die Kombination unterschiedlicher Methoden und Techniken unter Einbezug rationaler Erkenntnisse die Evolution der Stereospezifität von Proteasen erfolgreich sein kann.

# Literaturverzeichnis

Adams JM "On the release of the formyl group from nascent protein." *J Mol Biol* 33(3) S. 571 (1968)

Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Echols N, Headd JJ, Hung LW, et al. "The PHENIX software for automated determination of macromolecular structures." *Methods* 55(1) S. 94 (2011)

Aguirre C, Condado-Morales I, Olguin LF & Costas M "Isothermal titration calorimetry determination of individual rate constants of trypsin catalytic activity." *Anal Biochem* 479 S. 18 (2015)

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3) S. 403 (1990)

Amblard M, Fehrentz JA, Martinez J & Subra G "Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis." *Mol Biotechnol* 33(3) S. 239 (2006)

Andersen DC & Krummen L "Recombinant protein expression for therapeutic applications." *Curr Opin Biotechnol* 13(2) S. 117 (2002)

Arias CA, Martin-Martinez M, Blundell TL, Arthur M, Courvalin P & Reynolds PE "Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174." *Mol Microbiol* 31(6) S. 1653 (1999)

Armbrust F "Studien zur Evaluierung des synthetischen Potentials ausgewählter Trypsinvarianten." Bachelorarbeit Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (2014)

Arnett EM, Miller JG & Day AR "Effect of Structure on Reactivity IV. Aminolysis of Esters with Secondary Amines." *J Am Chem Soc* 73(11) S. 5393 (1951)

Asano Y, Ito H, Dairi T & Kato Y "An alkaline D-stereospecific endopeptidase with  $\beta$ -lactamase activity from *Bacillus cereus*." *J Bacteriol Chem* 271(47) S. 30256 (1996)

Asano Y, Mori T, Hanamoto S, Kato Y & Nakazawa A "A New D-Stereospecific Amino-Acid Amidase from *Ochrobactrum-Anthropi*." *Biochem Biophys Res Commun* 162(1) S. 470 (1989a)

Asano Y, Nakazawa A, Kato Y & Kondo K "Properties of a Novel D-Stereospecific Aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*." *J Biol Chem* 264(24) S. 14233 (1989b)

Asano Y, Umezaki M, Li YF, Tsubota S & Lubbehusen TL "Isolation of microorganisms which utilize acidic D-amino acid oligomers." *J Mol Catal B-Enzym* 12(1-6) S. 53 (2001)

Atlas D & Berger A "Size and stereospecificity of the active site of porcine elastase." *Biochemistry* 12(14) S. 2573 (1973)

Atrih A, Bacher G, Allmaier G, Williamson MP & Foster SJ "Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation." *J Bacteriol* 181(13) S. 3956 (1999)

Aucoin MG, Mena JA & Kamen AA "Bioprocessing of baculovirus vectors: a review." *Curr Gene Ther* 10(3) S. 174 (2010)

Aumuller T, Jahreis G, Fischer G & Schiene-Fischer C "Role of prolyl cis/trans isomers in cyclophilin-assisted *Pseudomonas syringae* AvrRpt2 protease activation." *Biochemistry* 49(5) S. 1042 (2010)

- Baker WL & Lonergan GT* "Chemistry of some fluorescamine-amine derivatives with relevance to the biosynthesis of benzylpenicillin by fermentation." *J Chem Tech and Biotech* 77(12) S. 1283 (2002)
- Baneyx F & Mujacic M* "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." *Nat Biotechnol* 22(11) S. 1399 (2004)
- Barbas CF, Matos JR, West JB & Wong CH* "A Search for Peptide Ligase - Cosolvent-Mediated Conversion of Proteases to Esterases for Irreversible Synthesis of Peptides." *J Am Chem Soc* 110(15) S. 5162 (1988)
- Barbas CF & Wong CH* "Papain Catalyzed Peptide-Synthesis - Control of Amidase Activity and the Introduction of Unusual Amino-Acids." *J Chem Soc*(8) S. 533 (1987)
- Barrell BG, Bankier AT & Drouin J* "A different genetic code in human mitochondria." *Nature* 282(5735) S. 189 (1979)
- Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S & Blanot D* "Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis." *FEMS Microbiol Rev* 32(2) S. 168 (2008)
- Baumann JB* "Solvent Selection for Recrystallization - Undergraduate Organic Experiment." *J Chem Educ* 56(1) S. 64 (1979)
- Becker K* "Charakterisierung neuartiger D-stereospezifischer Hydrolysen aus *Bacillus thuringiensis* serovar berliner " Masterarbeit Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (2013)
- Ben-Zvi AP & Goloubinoff P* "Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones." *J Struct Biol* 135(2) S. 84 (2001)
- Bender ML, Gunter CR, Kezdy FJ & Clement GE* "Kinetics of  $\alpha$ -Chymotrypsin Reactions in Presence of Added Nucleophiles." *J Am Chem Soc* 86(18) S. 3697 (1964)
- Bergmann M & Fraenkel-Conrat H* "The role of specificity in the enzymatic synthesis of proteins: synthesis with intracellular enzymes." *J Biol Chem* 119 S. 707 (1937)
- Bergmann M, Fruton JS & Pollok H* "The specificity of trypsin." *J Biol Chem* 127(3) S. 643 (1939)
- Berkmen M* "Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* 82(1) S. 240 (2012)
- Bessette PH, Aslund F, Beckwith J & Georgiou G* "Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm." *PNAS* 96(24) S. 13703 (1999)
- Better M, Chang CP, Robinson RR & Horwitz AH* "*Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment." *Science* 240(4855) S. 1041 (1988)
- Bian F, Yue S, Peng Z, Zhang X, Chen G, Yu J, Xuan N, et al.* "A Comprehensive Alanine-Scanning Mutagenesis Study Reveals Roles for Salt Bridges in the Structure and Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase." *PLoS One* 10(3) S. e0121108 (2015)

- Blaudeck N, Kreutzenbeck P, Freudl R & Sprenger GA* "Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane." *J Bacteriol* 185(9) S. 2811 (2003)
- Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR & Hofsteenge J* "The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment." *Embo J* 8(11) S. 3467 (1989)
- Boder ET & Wittrup KD* "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries." *Nat Biotechnol* 15(6) S. 553 (1997)
- Bohlke N & Budisa N* "Sense codon emancipation for proteome-wide incorporation of noncanonical amino acids: rare isoleucine codon AUA as a target for genetic code expansion." *FEMS Microbiol Lett* 351(2) S. 133 (2014)
- Boniface A, Bouhss A, Mengin-Lecreux D & Blanot D* "The MurE synthetase from *Thermotoga maritima* is endowed with an unusual D-lysine adding activity." *J Biol Chem* 281(23) S. 15680 (2006)
- Bordusa F* "Proteases in organic synthesis." *Chem Rev* 102(12) S. 4817 (2002)
- Bordusa F, Ullmann D, Elsner C & Jakubke HD* "Substrate mimetic mediated peptide synthesis: An irreversible ligation strategy that is independent of substrate specificity." *Angew Chem Int Ed Engl* 36(22) S. 2473 (1997)
- Boschwitz H, Halvorson HO, Keynan A & Milner Y* "Trypsinlike enzymes from dormant and germinated spores of *Bacillus cereus* T and their possible involvement in germination." *J Bacteriol* 164(1) S. 302 (1985)
- Braman J, Papworth C & Greener A* "Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates." *Methods Mol Biol* 57 S. 31 (1996)
- Buchan DW, Minneci F, Nugent TC, Bryson K & Jones DT* "Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench." *Nucleic Acids Res* 41(Web Server issue) S. W349 (2013)
- Budisa N, Minks C, Alefelder S, Wenger W, Dong F, Moroder L & Huber R* "Toward the experimental codon reassignment in vivo: protein building with an expanded amino acid repertoire." *FASEB J* 13(1) S. 41 (1999)
- Buller AR & Townsend CA* "Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad." *PNAS* 110(8) S. E653 (2013)
- Caligiuri A, D'Arrigo P, Rosini E, Tessaro D, Molla G, Servi S & Pollegioni L* "Enzymatic Conversion of Unnatural Amino Acids by Yeast D-Amino Acid Oxidase." *Adv. Synth. Catal* 348 S. 2183 (2006)
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C & Cregg JM* "Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*." *Curr Opin Biotechnol* 13(4) S. 329 (2002)
- Cerovsky V & Bordusa F* "Protease-catalyzed fragment condensation via substrate mimetic strategy: a useful combination of solid-phase peptide synthesis with enzymatic methods." *J Pept Res* 55(4) S. 325 (2000)



- Cheggour A, Fanuel L, Duez C, Joris B, Bouillenne F, Devreese B, Van Driessche G, et al.* "The dppA gene of *Bacillus subtilis* encodes a new D-aminopeptidase." *Molecular Microbiology* 38(3) S. 504 (2000)
- Chen FMF, Lee Y, Steinauer R & Benoiton NL* "Mixed Anhydrides in Peptide-Synthesis - a Study of Urethane Formation with a Contribution on Minimization of Racemization." *Can J Chem* 65(3) S. 613 (1987)
- Chen K & Arnold FH* "Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide." *PNAS* 90(12) S. 5618 (1993)
- Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, et al.* "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 1) S. 12 (2010)
- Chen Y, McReynolds A & Shoichet BK* "Re-examining the role of Lys67 in class C  $\beta$ -lactamase catalysis." *Protein Sci* 18(3) S. 662 (2009)
- Citri N & Zyk N* "Stereospecificity of the catalytic reaction of L-asparaginase." *Biochemistry* 11(11) S. 2103 (1972)
- Collaborative-Computational-Project* "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 4 S. 760 (1994)
- Corpet F* "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." *Nucleic Acids Res* 16(22) S. 10881 (1988)
- Cougoux A, Gibold L, Robin F, Dubois D, Pradel N, Darfeuille-Michaud A, Dalmasso G, et al.* "Analysis of structure-function relationships in the colibactin-maturing enzyme ClbP." *J Mol Biol* 424(3-4) S. 203 (2012)
- Crick FH* "The origin of the genetic code." *J Mol Biol* 38(3) S. 367 (1968)
- D'Aniello A, D'Onofrio G, Pischetola M, D'Aniello G, Vetere A, Petrucelli L & Fisher GH* "Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids." *J Biol Chem* 268(36) S. 26941 (1993)
- Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I & Kent SB* "Synthesis of proteins by native chemical ligation." *Science* 266(5186) S. 776 (1994)
- Delfosse V, Girard E, Birck C, Delmarcelle M, Delarue M, Poch O, Schultz P, et al.* "Structure of the archaeal pab87 peptidase reveals a novel self-compartmentalizing protease family." *PLoS One* 4(3) S. e4712 (2009)
- Dieckmann R, Neuhofer T, Pavela-Vrancic M & von Dohren H* "Dipeptide synthesis by an isolated adenylate-forming domain of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS)." *FEBS Lett* 498(1) S. 42 (2001)
- Dorr BM, Ham HO, An CH, Chaikof EL & Liu DR* "Reprogramming the specificity of sortase enzymes." *PNAS* 111(37) S. 13343 (2014)
- Drenth J* "Principles of Protein X-Ray Crystallography." Springer-Verlag New York (2007)

- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J & Barton GJ* "JPred4: a protein secondary structure prediction server." *Nucleic Acids Res* S. (2015)
- Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, Bouchon B, et al.* "ClbP is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides." *J Biol Chem* 286(41) S. 35562 (2011)
- Dubus A, Ledent P, Lamotte-Brasseur J & Frere JM* "The roles of residues Tyr150, Glu272, and His314 in class C  $\beta$ -lactamases." *Proteins* 25(4) S. 473 (1996)
- Eadie GS* "The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine." *Journal of Biological Chemistry* 146(1) S. 85 (1942)
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG & Cowtan K* "Features and development of COOT." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 4) S. 486 (2010)
- Engh RA, Brandstetter H, Sucher G, Eichinger A, Baumann U, Bode W, Huber R, et al.* "Enzyme flexibility, solvent and 'weak' interactions characterize thrombin-ligand interactions: implications for drug design." *Structure* 4(11) S. 1353 (1996)
- Fairbrother RW & Williams BL* "Two new antibiotics; antibacterial activity of novobiocin and vancomycin." *Lancet* 271(6954) S. 1177 (1956)
- Fanuel L, Granier B, Wilkin JM, Bellefroid-Bourguignon C, Joris B, Knowles J, Komives E, et al.* "The precursor of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase containing a C-terminal extension is inactive." *FEBS Lett* 351(1) S. 49 (1994)
- Fanuel L, Thamm I, Kostanjevecki V, Samyn B, Joris B, Goffin C, Brannigan J, et al.* "Two new aminopeptidases from *Ochrobactrum anthropi* active on D-alanyl-p-nitroanilide." *Cell Mol Life Sci* 55(5) S. 812 (1999)
- Fastrez J & Fersht AR* "Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin." *Biochemistry* 12(11) S. 2025 (1973)
- Fedarovich A, Nicholas RA & Davies C* "Unusual conformation of the SxN motif in the crystal structure of penicillin-binding protein A from *Mycobacterium tuberculosis*." *J Mol Biol* 398(1) S. 54 (2010)
- Fersht AR* "Enzyme Structure and Mechanism." W. H. Freeman & Co. New York (1985)
- Filippova IY, Lysogorskaya EN, Anisimova VV, Suvorov LI, Oksenoit ES & Stepanov VM* "Fluorogenic peptide substrates for assay of aspartyl proteinases." *Anal Biochem* 234(2) S. 113 (1996)
- Firth AE & Patrick WM* "GLUE-IT and PEDEL-AA: new programmes for analyzing protein diversity in randomized libraries." *Nucleic Acids Res* 36(Web Server issue) S. W281 (2008)
- Fischer E & Mouneyrat A* "Divison of some racmic amino acids in optical active components." *Ber Dtsch Chem Ges* 33 S. 2383 (1900)
- Fisher JF, Meroueh SO & Mobashery S* "Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity." *Chem Rev* 105(2) S. 395 (2005)

- Fleming A* "On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. Influenzae*." *Brit J Exp Path* 10(3) S. 226 (1929)
- Flory P* "Statistical Mechanisms of Chain Molecules." Hanser Publisher (1989)
- Fontana A, Spolaore B, Mero A & Veronese FM* "Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase." *Adv Drug Deliv Rev* 60(1) S. 13 (2008)
- Förster T* "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." *Ann Phys-Berlin* 2(1-2) S. 55 (1948)
- Franke L, Liebscher S & Bordusa F* "Engineering the oxyanion hole of trypsin for promoting the reverse of proteolysis." *J Pept Sci* 20(2) S. 128 (2014)
- Frerot E, Coste J, Pantaloni A, Dufour MN & Jouin P* "Pybop and Pybrop - Two Reagents for the Difficult Coupling of the  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Dialkyl Amino-Acid, Aib." *Tetrahedron* 47(2) S. 259 (1991)
- Fujii N* "D-amino acids in living higher organisms." *Orig Life Evol Biosph* 32(2) S. 103 (2002)
- Funabashi M, Yang Z, Nonaka K, Hosobuchi M, Fujita Y, Shibata T, Chi X, et al.* "An ATP-independent strategy for amide bond formation in antibiotic biosynthesis." *Nat Chem Biol* 6(8) S. 581 (2010)
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD & Bairoch A* "Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server;." *The Proteomics Protocols Handbook* S. 571 (2005)
- GE-Healthcare* "HiLoad™ 16/600 and 26/600 Superdex™ 30 prep grad / HiLoad 16/600 and 26/600 Superdex 75 prep grade/ HiLoad 16/600 and 26/600 Superdex 200 prep grade." *Handbuch Uppsala, Sweden* (2001)
- Gershkovich AA & Kholodovych VV* "Fluorogenic substrates for proteases based on intramolecular fluorescence energy transfer (IFETS)." *J Biochem Biophys Methods* 33(3) S. 135 (1996)
- Gherman BF, Goldberg SD, Cornish VW & Friesner RA* "Mixed quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) study of the deacylation reaction in a penicillin binding protein (PBP) versus in a class C  $\beta$ -lactamase." *J Am Chem Soc* 126(24) S. 7652 (2004)
- Ghosh AS, Chowdhury C & Nelson DE* "Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in *Escherichia coli*." *Trends Microbiol* 16(7) S. 309 (2008)
- Gill SC & von Hippel PH* "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." *Anal Biochem* 182(2) S. 319 (1989)
- Glaser F, Rosenberg Y, Kessel A, Pupko T & Ben-Tal N* "The ConSurf-HSSP database: the mapping of evolutionary conservation among homologs onto PDB structures." *Proteins* 58(3) S. 610 (2005)
- Gofshtein-Gandman LV, Keynan A & Milner Y* "Bacteria of the genus *Bacillus* have a hydrolase stereospecific to the D isomer of benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide." *J Bacteriol* 170(12) S. 5895 (1988)
- Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis V & Lereclus D* "A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes." *Proteomics* 5(14) S. 3696 (2005)

- Goswami A & Van Lanen SG* "Enzymatic strategies and biocatalysts for amide bond formation: tricks of the trade outside of the ribosome." *Mol Biosyst* 11(2) S. 338 (2015)
- Goudar CT, Sonnad JR & Duggleby RG* "Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation." *Biochim Biophys Acta* 1429(2) S. 377 (1999)
- Gray WR, Olivera BM & Cruz LJ* "Peptide toxins from venomous *Conus* snails." *Annu Rev Biochem* 57 S. 665 (1988)
- Green MR & Sambrook J* "Molecular Cloning." Cold Spring harbor Laboratory Press (2012)
- Gross E* "The peptides: Analysis, synthesis, biology." Academic Press, New York (1979-1987)
- Gunther R, Stein A & Bordusa F* "Investigations on the enzyme specificity of clostripain: a new efficient biocatalyst for the synthesis of peptide isosteres." *J Org Chem* 65(6) S. 1672 (2000)
- Gutheil WG, Stefanova ME & Nicholas RA* "Fluorescent coupled enzyme assays for D-alanine: application to penicillin-binding protein and vancomycin activity assays." *Anal Biochem* 287(2) S. 196 (2000)
- Gutte B & Merrifield RB* "The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity." *J Am Chem Soc* 91(2) S. 501 (1969)
- Guttilla IK, Gaspar AH, Swierczynski A, Swaminathan A, Dwivedi P, Das A & Ton-That H* "Acyl enzyme intermediates in sortase-catalyzed pilus morphogenesis in gram-positive bacteria." *J Bacteriol* 191(18) S. 5603 (2009)
- Hanahan D, Jessee J & Bloom FR* "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria." *Methods Enzymol* 204 S. 63 (1991)
- Hancock REW* "Peptide antibiotics." *Lancet* 349(9049) S. 418 (1997)
- Hanes CS* "Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley." *Biochem J* 26(5) S. 1406 (1932)
- Hargis JC, Vankayala SL, White JK & Woodcock HL* "Identification and Characterization of Noncovalent Interactions That Drive Binding and Specificity in DD-Peptidases and  $\beta$ -Lactamases." *J Chem Theory Comput* 10(2) S. 855 (2014a)
- Hargis JC, White JK, Chen Y & Woodcock HL* "Can molecular dynamics and QM/MM solve the penicillin binding protein protonation puzzle?" *J Chem Inf Model* 54(5) S. 1412 (2014b)
- Hasselbalch KA* "The calculation of the hydrogen content in blood from free and combined carbonic acid, and the oxygen compound of the blood as the function of the hydrogen content." *Biochem Z* 78 S. 112 (1917)
- Hata M, Fujii Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Ishii M, Neya S, Tsuda M, et al.* "Substrate deacylation mechanisms of serine- $\beta$ -lactamases." *Biol Pharm Bull* 29(11) S. 2151 (2006)
- Hawkins AJ* "Protein-Turnover - a Functional Appraisal." *Func Eco* 5(2) S. 222 (1991)

- Hedstrom L* "An overview of serine proteases." *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 21 Unit 21 10 (2002a)
- Hedstrom L* "Serine protease mechanism and specificity." *Chem Rev* 102(12) S. 4501 (2002b)
- Hedstrom L, Farr-Jones S, Kettner CA & Rutter WJ* "Converting trypsin to chymotrypsin: ground-state binding does not determine substrate specificity." *Biochemistry* 33(29) S. 8764 (1994a)
- Hedstrom L, Perona JJ & Rutter WJ* "Converting trypsin to chymotrypsin: residue 172 is a substrate specificity determinant." *Biochemistry* 33(29) S. 8757 (1994b)
- Hedstrom L, Szilagyi L & Rutter WJ* "Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops." *Science* 255(5049) S. 1249 (1992)
- Hendrickx AP, Budzik JM, Oh SY & Schneewind O* "Architects at the bacterial surface - sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds." *Nat Rev Microbiol* 9(3) S. 166 (2011)
- Henke E & Bornscheuer UT* "Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay." *Biol Chem* 380(7-8) S. 1029 (1999)
- Hertzberg RP & Pope AJ* "High-throughput screening: new technology for the 21st century." *Curr Opin Chem Biol* 4(4) S. 445 (2000)
- Herzberg O & Moulton J* "Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å resolution." *Science* 236(4802) S. 694 (1987)
- Ho HT, Falk PJ, Ervin KM, Krishnan BS, Discotto LF, Dougherty TJ & Pucci MJ* "UDP-N-acetylmuramyl-L-alanine functions as an activator in the regulation of the *Escherichia coli* glutamate racemase activity." *Biochemistry* 34(8) S. 2464 (1995)
- Hoffmann K, Schneider-Scherzer E, Kleinkauf H & Zocher R* "Purification and characterization of eucaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporin biosynthesis." *J Biol Chem* 269(17) S. 12710 (1994)
- Hofmann MA & Brian DA* "Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony." *Biotechniques* 11(1) S. 30 (1991)
- Hofstee BHI* "Non-Inverted Versus Inverted Plots in Enzyme Kinetics." *Nature* 184(4695) S. 1296 (1959)
- Höger G* "Studien zur Verifizierung eines Screeningsystems zur Generierung D-stereospezifischer Trypsin-Varianten." Masterarbeit Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (2014)
- Holm L & Rosenstrom P* "Dali server: conservation mapping in 3D." *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue) S. W545 (2010)
- Homandberg GA, Mattis JA & Laskowski M, Jr.* "Synthesis of peptide bonds by proteinases. Addition of organic cosolvents shifts peptide bond equilibria toward synthesis." *Biochemistry* 17(24) S. 5220 (1978)

- Homma H, Hamase K, Lee JA, Sakai K, Takigawa Y, Fukushima T, Santa T, et al. "Regional distribution of D-amino acids in the rat brain." *Faseb Journal* 11(3) S. 1224 (1997)
- Hormann K & Andreesen JR "Reductive Cleavage of Sarcosine and Betaine by *Eubacterium Acidaminophilum* Via Enzyme-Systems Different from Glycine Reductase." *Arch Microbiol* 153(1) S. 50 (1989)
- Hotchkiss RD & Dubos RJ "Fractionation of the bactericidal agent from cultures of a soil *bacillus*." *J Biol Chem* 132(2) S. 791 (1940)
- Huber R, Kukla D, Bode W, Schwager P, Bartels K, Deisenhofer J & Steigemann W "Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution." *J Mol Biol* 89(1) S. 73 (1974)
- Ibba M, Curnow AW & Soll D "Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal." *Trends Biochem Sci* 22(2) S. 39 (1997)
- Ibba M & Soll D "Quality control mechanisms during translation." *Science* 286(5446) S. 1893 (1999)
- Inoue H, Nojima H & Okayama H "High-Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids." *Gene* 96(1) S. 23 (1990)
- Isidro-Llobet A, Alvarez M & Albericio F "Amino acid-protecting groups." *Chem Rev* 109(6) S. 2455 (2009)
- Isowa Y, Ohmori M, Ichikawa T, Mori K, Nonaka Y, Kihara K, Oyama K, et al. "Thermolysin-Catalyzed Condensation-Reactions of *N*-Substituted Aspartic and Glutamic Acids with Phenylalanine Alkyl Esters." *Tetrahedron Lett*(28) S. 2611 (1979)
- Ito H, Fukuda Y, Murata K & Kimura A "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *J Bacteriol* 153(1) S. 163 (1983)
- Itoh K, Sekizaki H, Toyota E & Tanizawa K "Methyltrypsin-catalyzed peptide coupling: Comparison of alkyl ester and guanidinophenyl ester derivatives as acyl donor component." *Bioorg Chem* 25(5-6) S. 307 (1997)
- Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, Bhattacharyya A, et al. "Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*." *Nature* 423(6935) S. 87 (2003)
- Jack RL, Buchanan G, Dubini A, Hatzixanthis K, Palmer T & Sargent F "Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins." *Embo J* 23(20) S. 3962 (2004)
- Jackel C, Kast P & Hilvert D "Protein design by directed evolution." *Annu Rev Biophys* 37 S. 153 (2008)
- Jakubke HD, Kuhl P & Konnecke A "Basic Principles of Protease-Catalyzed Peptide-Bond Formation." *Angew Chem Int Ed Engl* 24(2) S. 85 (1985)
- Jeong JH, Kim YS, Rojviriyaya C, Ha SC, Kang BS & Kim YG "Crystal structures of bifunctional penicillin-binding protein 4 from *Listeria monocytogenes*." *Antimicrob Agents Chemother* 57(8) S. 3507 (2013)

- Johnson BH & Hecht MH "Recombinant Proteins Can Be Isolated from *Escherichia coli*-Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing." *Bio-Technol* 12(13) S. 1357 (1994)
- Kabsch W "XDS." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 2) S. 125 (2010)
- Kain SR, Adams M, Kondepudi A, Yang TT, Ward WW & Kitts P "Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization." *Biotechniques* 19(4) S. 650 (1995)
- Kaman WE, Arkoubi-El Arkoubi NE, Roffel S, Endtz HP, van Belkum A, Bikker FJ & Hays JP "Evaluation of a FRET-peptide substrate to predict virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS One* 8(11) S. e81428 (2013a)
- Kaman WE, Voskamp-Visser I, de Jongh DM, Endtz HP, van Belkum A, Hays JP & Bikker FJ "Evaluation of a D-amino-acid-containing fluorescence resonance energy transfer peptide library for profiling prokaryotic proteases." *Anal Biochem* 441(1) S. 38 (2013b)
- Kameda Y, Toyoura E, Yamazoe H, Kimura Y & Yasuda Y "Hydrolysis and metabolism by soil bacteria of benzoyl derivatives of D- and L-forms of some amino-acids." *Nature* 170(4334) S. 888 (1952)
- Kato S, Ishihara T, Hemmi H, Kobayashi H & Yoshimura T "Alterations in D-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines." *J Biosci Bioeng* 111(1) S. 104 (2011)
- Keegan RM & Winn MD "Automated search-model discovery and preparation for structure solution by molecular replacement." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63(Pt 4) S. 447 (2007)
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN & Sternberg MJ "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." *Nat Protoc* 10(6) S. 845 (2015)
- Kelly JA, Knox JR, Moews PC, Hite GJ, Bartolone JB, Zhao H, Joris B, et al. "2.8-Å Structure of penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and complexes with  $\beta$ -lactams." *J Biol Chem* 260(10) S. 6449 (1985)
- Kelly JA & Kuzin AP "The refined crystallographic structure of a DD-peptidase penicillin-target enzyme at 1.6 Å resolution." *J Mol Biol* 254(2) S. 223 (1995)
- Kennedy J, Auclair K, Kendrew SG, Park C, Vederas JC & Hutchinson CR "Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis." *Science* 284(5418) S. 1368 (1999)
- Kenrick SA & Daugherty PS "Bacterial display enables efficient and quantitative peptide affinity maturation." *Protein Eng Des Sel* 23(1) S. 9 (2010)
- Khaliullin IG, Suplatov DA, Shalaeva DN, Otsuka M, Asano Y & Svedas VK "Bioinformatic Analysis, Molecular Modeling of Role of Lys65 Residue in Catalytic Triad of D-aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*." *Acta Naturae* 2(2) S. 66 (2010)
- Kibbe WA "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator." *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue) S. W43 (2007)
- Kim JY, Kim YG & Lee GM "CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential." *Appl Microbiol Biotechnol* 93(3) S. 917 (2012)

- King M & Wagner A* "Developments in the field of bioorthogonal bond forming reactions-past and present trends." *Bioconjug Chem* 25(5) S. 825 (2014)
- Kino K, Kotanaka Y, Arai T & Yagasaki M* "A novel L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis* NBRC3134, a microorganism producing peptide-antibiotic rhizocticin." *Biosci Biotechnol Biochem* 73(4) S. 901 (2009)
- Kinscherf TG & Willis DK* "The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam antibiotic tabtoxin in *Pseudomonas syringae*." *J Antibiot* 58(12) S. 817 (2005)
- Kitaguchi H & Klibanov AM* "Enzymatic Peptide-Synthesis Via Segment Condensation in the Presence of Water Mimics." *Journal of the American Chemical Society* 111(26) S. 9272 (1989)
- Kitamura A, Nagata K & Kinjo M* "Conformational Analysis of Misfolded Protein Aggregation by FRET and Live-Cell Imaging Techniques." *Int J Mol Sci* 16(3) S. 6076 (2015)
- Kolb HC, Finn MG & Sharpless KB* "Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions." *Angew Chem Int Ed Engl* 40(11) S. 2004 (2001)
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R & Losick R* "D-amino acids trigger biofilm disassembly." *Science* 328(5978) S. 627 (2010)
- Komeda H & Asano Y* "Synthesis of D-phenylalanine oligopeptides catalyzed by alkaline D-peptidase from *Bacillus cereus* DF4-B." *J Mol Catal B-Enzym* 6(3) S. 379 (1999)
- Komeda H & Asano Y* "Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the D-stereospecific amino-acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3." *Eur J Biochem* 267(7) S. 2028 (2000)
- Komeda H & Asano Y* "Genes for an alkaline D-stereospecific endopeptidase and its homolog are located in tandem on *Bacillus cereus* genome." *FEMS Microbiol Lett* 228(1) S. 1 (2003)
- Komeda H & Asano Y* "A novel D-stereoselective amino acid amidase from *Brevibacterium iodinum*: Gene cloning, expression and characterization." *Enzyme Microb Tech* 43(3) S. 276 (2008)
- König W & Geiger R* "A new method for the synthesis of peptides: activation of the carboxy group with dicyclohexylcarbodiimide and 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine." *Chem Ber* 103(7) S. 2034 (1970)
- Koshland DE, Jr.* "The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory." *Angew Chem Int Ed Engl* 33 S. 2375 (1995)
- Krebs HA* "Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids." *Biochem J* 29(7) S. 1620 (1935)
- Krissinel E & Henrick K* "Inference of macromolecular assemblies from crystalline state." *Journal of Molecular Biology* 372(3) S. 774 (2007)
- Kuhl P & Jakubke HD* "Protease-catalyzed synthesis of peptides in biphasic aqueous-organic systems." *Pharmazie* 45(6) S. 393 (1990)



- Kuhlewein A, Voll G, Hernandez Alvarez B, Kessler H, Fischer G, Rahfeld JU & Gemmecker G "Solution structure of *Escherichia coli* Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases." *Protein Sci* 13(9) S. 2378 (2004)
- Kühne W "Über die Verdauung der Eiweissstoffe durch den Pancreassaft." *Virchows Arch.* 39 S. 130 (1867)
- Kunitz M "Formation of Trypsin from Crystalline Trypsinogen by Means of Enterokinase." *J Gen Physiol* 22(4) S. 429 (1939)
- Kurotsu T, Marahiel MA, Muller KD & Kleinkauf H "Characterization of an intracellular serine protease from sporulating cells of *Bacillus brevis*." *J Bacteriol* 151(3) S. 1466 (1982)
- Laemmli UK "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259) S. 680 (1970)
- Lauer B, Russwurm R, Schwarz W, Kalmanczhelyi A, Bruntner C, Rosemeier A & Bormann C "Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tu901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety and assembly of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin." *Mol Gen Genetics* 264(5) S. 662 (2001)
- Lawson WB, Valenty VB, Wos JD & Lobo AP "Studies on the inhibition of human thrombin: effects of plasma and plasma constituents." *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 109(1) S. 52 (1982)
- Lebar MD, May JM, Meeske AJ, Leiman SA, Lupoli TJ, Tsukamoto H, Losick R, et al. "Reconstitution of peptidoglycan cross-linking leads to improved fluorescent probes of cell wall synthesis." *J Am Chem Soc* 136(31) S. 10874 (2014)
- Lee DC, Lee SG, Hong SP, Sung MH & Kim HS "Cloning and overexpression of thermostable D-hydantoinase from thermophile in *E. coli* and its application to the synthesis of optically active D-amino acids." *Ann N Y Acad Sci* 799 S. 401 (1996)
- Leiman SA, Richardson C, Foulston L, Elsholz AK, First EA & Losick R "Identification and Characterization of Mutations Conferring Resistance to D-Amino Acids in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 197(9) S. 1632 (2015)
- Li XG & Kanerva LT "Lipases in  $\beta$ -dipeptide synthesis in organic solvents." *Org Lett* 8(24) S. 5593 (2006)
- Liebscher S, Kornberger P, Fink G, Trost-Gross EM, Hoss E, Skerra A & Bordusa F "Derivatization of antibody Fab fragments: a designer enzyme for native protein modification." *Chembiochem* 15(8) S. 1096 (2014a)
- Liebscher S, Schopf M, Aumüller T, Sharkhuukhen A, Pech A, Hoss E, Parthier C, et al. "N-terminal protein modification by substrate-activated reverse proteolysis." *Angew Chem Int Ed Engl* 53(11) S. 3024 (2014b)
- Lin S, Hanson RE & Cronan JE "Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway." *Nat Chem Biol* 6(9) S. 682 (2010)

- Lineweaver H & Burk D* "The determination of enzyme dissociation constants." *Journal of the American Chemical Society* 56 S. 658 (1934)
- Lobkovsky E, Billings EM, Moews PC, Rahil J, Pratt RF & Knox JR* "Crystallographic structure of a phosphonate derivative of the *Enterobacter cloacae* P99 cephalosporinase: mechanistic interpretation of a  $\beta$ -lactamase transition-state analog." *Biochemistry* 33(22) S. 6762 (1994)
- Longenecker KL, Stewart KD, Madar DJ, Jakob CG, Fry EH, Wilk S, Lin CW, et al.* "Crystal structures of DPP-IV (CD26) from rat kidney exhibit flexible accommodation of peptidase-selective inhibitors." *Biochemistry* 45(24) S. 7474 (2006)
- Lucaslen J & Lipmann F* "Protein Biosynthesis." *Ann Rev Biochem* 40 S. 409 (1971)
- Luke I, Handford JJ, Palmer T & Sargent F* "Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB." *Arch Microbiol* 191(12) S. 919 (2009)
- Lundt BF, Johansen NL, Volund A & Markussen J* "Removal of t-butyl and t-butoxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid. Mechanisms, biproduct formation and evaluation of scavengers." *Int J Pept Protein Res* 12(5) S. 258 (1978)
- Lutz S* "Beyond directed evolution--semi-rational protein engineering and design." *Curr Opin Biotechnol* 21(6) S. 734 (2010)
- Ma W, Tang C & Lai L* "Specificity of trypsin and chymotrypsin: loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant." *Biophys J* 89(2) S. 1183 (2005)
- Magnet S, Bellais S, Dubost L, Fourgeaud M, Mainardi JL, Petit-Frere S, Marie A, et al.* "Identification of the L,D-transpeptidases responsible for attachment of the Braun lipoprotein to *Escherichia coli* peptidoglycan." *J Bacteriol* 189(10) S. 3927 (2007)
- Mao H, Hart SA, Schink A & Pollok BA* "Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering." *J Am Chem Soc* 126(9) S. 2670 (2004)
- Markiewicz Z, Broome-Smith JK, Schwarz U & Spratt BG* "Spherical *E. coli* due to elevated levels of D-alanine carboxypeptidase." *Nature* 297(5868) S. 702 (1982)
- Matsumoto K, Davis BG & Jones JB* "Glycosylation of the primary binding pocket of a subtilisin protease causes a remarkable broadening in stereospecificity in peptide synthesis." *Chem Commun*(10) S. 903 (2001)
- Matsumoto M, Homma H, Long Z, Imai K, Iida T, Maruyama T, Aikawa Y, et al.* "Occurrence of free D-amino acids and aspartate racemases in hyperthermophilic archaea." *J Bacteriol* 181(20) S. 6560 (1999)
- Mazmanian SK, Ton-That H & Schneewind O* "Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*." *Mol Microbiol* 40(5) S. 1049 (2001)
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC & Read RJ* "Phaser crystallographic software." *J Appl Crystallogr* 40(Pt 4) S. 658 (2007)
- McDonough MA, Anderson JW, Silvaggi NR, Pratt RF, Knox JR & Kelly JA* "Structures of two kinetic intermediates reveal species specificity of penicillin-binding proteins." *J Mol Biol* 322(1) S. 111 (2002)

- McGaughey GB, Gagne M & Rappe AK " $\pi$ -Stacking interactions. Alive and well in proteins." *J Biol Chem* 273(25) S. 15458 (1998)
- McGrath ME, Haymore BL, Summers NL, Craik CS & Fletterick RJ "Structure of an engineered, metal-actuated switch in trypsin." *Biochemistry* 32(8) S. 1914 (1993)
- McPherson A "Introduction to protein crystallization." *Methods* 34(3) S. 254 (2004)
- Mendler CT, Friedrich L, Laitinen I, Schlapschy M, Schwaiger M, Wester HJ & Skerra A "High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation." *MAbs* 7(1) S. 96 (2015)
- Mergulhao FJ, Summers DK & Monteiro GA "Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*." *Biotechnol Adv* 23(3) S. 177 (2005)
- Merrifield RB "Solid Phase Peptide Synthesis: 1. Synthesis of a Tetrapeptide." *J Am Chem Soc* 85(14) S. 2149 (1963)
- Meselson M & Yuan R "DNA restriction enzyme from *E. coli*." *Nature* 217(5134) S. 1110 (1968)
- Michaelis L & Menten ML "The kinetics of the inversion effect." *Biochem Z* 49 S. 333 (1913)
- Mizushima N & Klionsky DJ "Protein turnover via autophagy: implications for metabolism." *Annu Rev Nutr* 27 S. 19 (2007)
- Monnaie D, Dubus A & Frere JM "The role of lysine-67 in a class C  $\beta$ -lactamase is mainly electrostatic." *Biochem J* 302 ( Pt 1) S. 1 (1994)
- Morihara K & Oka T " $\alpha$ -Chymotrypsin as the catalyst for peptide synthesis." *Biochem J* 163(3) S. 531 (1977)
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1 S. 263 (1986)
- Murphy BP & Pratt RF "Evidence for an oxyanion hole in serine  $\beta$ -lactamases and DD-peptidases." *Biochem J* 256(2) S. 669 (1988)
- Muteeb G & Sen R "Random mutagenesis using a mutator strain." *Methods Mol Biol* 634 S. 411 (2010)
- Nakano S, Okazaki S, Ishitsubo E, Kawahara N, Komeda H, Tokiwa H & Asano Y "Structural and computational analysis of peptide recognition mechanism of class-C type penicillin binding protein, alkaline D-peptidase from *Bacillus cereus* DF4-B." *Sci Rep* 5 S. 13836 (2015)
- Nakashima N, Mitani Y & Tamura T "Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins." *Microb Cell Fact* 4(1) S. 7 (2005)
- Nakatsuka T, Sasaki T & Kaiser ET "Peptide Segment Coupling Catalyzed by the Semisynthetic Enzyme Thiolsubtilisin." *J Am Chem Soc* 109(12) S. 3808 (1987)
- NEB "Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit." Handbuch Ipswich, Massachusetts, USA (2013)

- Negoro S, Ohki T, Shibata N, Sasa K, Hayashi H, Nakano H, Yasuhira K, et al.* "Nylon-oligomer degrading enzyme/substrate complex: catalytic mechanism of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase." *J Mol Biol* 370(1) S. 142 (2007)
- Nemmara VV, Dzhekueva L, Sarkar KS, Adediran SA, Duez C, Nicholas RA & Pratt RF* "Substrate specificity of low-molecular mass bacterial DD-peptidases." *Biochemistry* 50(46) S. 10091 (2011)
- Nesterenko MV, Tilley M & Upton SJ* "A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels." *J Biochem Biophys Methods* 28(3) S. 239 (1994)
- Neuhoff V, Stamm R & Eibl H* "Clear Background and Highly Sensitive Protein Staining with Coomassie Blue Dyes in Polyacrylamide Gels - a Systematic Analysis." *Electrophoresis* 6(9) S. 427 (1985)
- Neylon C* "Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution." *Nucleic Acids Res* 32(4) S. 1448 (2004)
- Nguyen DP, Lusich H, Neumann H, Kapadnis PB, Deiters A & Chin JW* "Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry." *J Am Chem Soc* 131(25) S. 8720 (2009)
- Nichols DA, Hargis JC, Sanishvili R, Jaishankar P, Defrees K, Smith EW, Wang KK, et al.* "Ligand-Induced Proton Transfer and Low-Barrier Hydrogen Bond Revealed by X-ray Crystallography." *J Am Chem Soc* S. (2015)
- Nilsson BL, Hondal RJ, Soellner MB & Raines RT* "Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods." *J Am Chem Soc* 125(18) S. 5268 (2003)
- Nilsson BL, Kiessling LL & Raines RT* "Staudinger ligation: a peptide from a thioester and azide." *Org Lett* 2(13) S. 1939 (2000)
- Nisimoto Y, Otsuka-Murakami H & Lambeth DJ* "Reconstitution of flavin-depleted neutrophil flavocytochrome b558 with 8-mercapto-FAD and characterization of the flavin-reconstituted enzyme." *J Biol Chem* 270(27) S. 16428 (1995)
- Nov Y & Segev D* "Optimal codon randomization via mathematical programming." *J Theor Biol* 335 S. 147 (2013)
- Novagen* "pET System." Handbuch Billerica, Massachusetts, USA (2003)
- Novagen* "Competent Cells." Handbuch Billerica, Massachusetts, USA (2004)
- Novy R, Drott D, Yaeger K & Mierendorf R* "Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression." *inNovations* 12 S. 1 (2001)
- Oefner C, D'Arcy A, Daly JJ, Gubernator K, Charnas RL, Heinze I, Hubschwerlen C, et al.* "Refined crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for  $\beta$ -lactam hydrolysis." *Nature* 343(6255) S. 284 (1990)

- Okazaki S, Suzuki A, Komeda H, Asano Y & Yamane T "Deduced catalytic mechanism of D-amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3." *Journal of Synchrotron Radiation* 15 S. 250 (2008a)
- Okazaki S, Suzuki A, Mizushima T, Komeda H, Asano Y & Yamane T "Structures of D-amino-acid amidase complexed with L-phenylalanine and with L-phenylalanine amide: insight into the D-stereospecificity of D-amino-acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3." *Acta Crystallogr D* 64 S. 331 (2008b)
- Oliphant AR, Nussbaum AL & Struhl K "Cloning of random-sequence oligodeoxynucleotides." *Gene* 44(2-3) S. 177 (1986)
- Oliver DB, Cabelli RJ, Dolan KM & Jarosik GP "Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21) S. 8227 (1990)
- Otto HH & Schirmeister T "Cysteine Proteases and Their Inhibitors." *Chem Rev* 97(1) S. 133 (1997)
- Overton TW "Recombinant protein production in bacterial hosts." *Drug Discov Today* 19(5) S. 590 (2014)
- Park JH, Kim GJ & Kim HS "Production of D-amino acid using whole cells of recombinant *Escherichia coli* with separately and coexpressed D-hydantoinase and *N*-carbamoylase." *Biotechnol Prog* 16(4) S. 564 (2000)
- Park JS, Lee WC, Yeo KJ, Ryu KS, Kumarasiri M, Heseck D, Lee M, et al. "Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane." *FASEB J* 26(1) S. 219 (2012)
- Patriarc P, Beckerdi S & Elsbach P "Phospholipases and Phospholipid Turnover in *Escherichia coli* Spheroplasts." *Biochim Biophys Acta* 260(4) S. 593 (1972)
- Patrick WM, Firth AE & Blackburn JM "User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries." *Protein Eng* 16(6) S. 451 (2003)
- Pavelka A, Chovancova E & Damborsky J "HotSpot Wizard: a web server for identification of hot spots in protein engineering." *Nucleic Acids Res* 37(Web Server issue) S. W376 (2009a)
- Pavelka A, Chovancova E & Damborsky J "HotSpot Wizard: a web server for identification of hot spots in protein engineering." *Nucleic Acids Research* 37 S. W376 (2009b)
- Petersen EI, Valinger G, Solkner B, Stubenrauch G & Schwab H "A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to  $\beta$ -lactamases and DD-peptidases." *J Biotechnol* 89(1) S. 11 (2001)
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G & Nielsen H "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." *Nat Methods* 8(10) S. 785 (2011)
- Pisithkul T, Patel NM & Amador-Noguez D "Post-translational modifications as key regulators of bacterial metabolic fluxes." *Curr Opin Microbiol* 24 S. 29 (2015)
- Polgar L "Oligopeptidase B: a new type of serine peptidase with a unique substrate-dependent temperature sensitivity." *Biochemistry* 38(47) S. 15548 (1999)

- Pontiroli AE* "Peptide hormones: Review of current and emerging uses by nasal delivery." *Adv Drug Deliv Rev* 29(1-2) S. 81 (1998)
- Powell S, Szklarczyk D, Trachana K, Roth A, Kuhn M, Muller J, Arnold R, et al.* "eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges." *Nucleic Acids Res* 40(Database issue) S. D284 (2012)
- Pratt RF* "Substrate specificity of bacterial DD-peptidases (penicillin-binding proteins)." *Cell Mol Life Sci* 65(14) S. 2138 (2008)
- Pratt RF & McLeish MJ* "Structural relationship between the active sites of  $\beta$ -lactam-recognizing and amidase signature enzymes: convergent evolution?" *Biochemistry* 49(45) S. 9688 (2010)
- Purdie JE, Demayo RE, Seely JH & Benoiton NL* "The trypsin-catalysed hydrolysis of D-lysine and D-arginine ethyl esters." *Biochim Biophys Acta* 268(2) S. 523 (1972)
- Radisky ES, Lee JM, Lu CJ & Koshland DE, Jr.* "Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates." *Proc Natl Acad Sci* 103(18) S. 6835 (2006)
- Rall K* "Untersuchungen zur Optimierung der Serinprotease Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthese." Dissertation Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (2004)
- Rauh D, Klebe G & Stubbs MT* "Understanding protein-ligand interactions: the price of protein flexibility." *J Mol Biol* 335(5) S. 1325 (2004)
- Rauh D, Reyda S, Klebe G & Stubbs MT* "Trypsin mutants for structure-based drug design: expression, refolding and crystallisation." *Biol Chem* 383(7-8) S. 1309 (2002)
- Rawlings ND, Barrett AJ & Bateman A* "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." *Nucleic Acids Res* 40(Database issue) S. D343 (2012)
- Reddy TB, Thomas AD, Stamatis D, Bertsch J, Isbandi M, Jansson J, Mallajosyula J, et al.* "The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta)genome project classification." *Nucleic Acids Res* 43(Database issue) S. D1099 (2015)
- Reetz MT* "Laboratory evolution of stereoselective enzymes: a prolific source of catalysts for asymmetric reactions." *Angew Chem Int Ed Engl* 50(1) S. 138 (2011)
- Reetz MT & Carballeira JD* "Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes." *Nat Protoc* 2(4) S. 891 (2007)
- Reetz MT, Carballeira JD & Vogel A* "Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability." *Angew Chem Int Ed Engl* 45(46) S. 7745 (2006)
- Ressler C & Du Vigneaud V* "Bromination of performic acid-oxidized oxytocin." *J Biol Chem* 211(2) S. 809 (1954)
- Robert X & Gouet P* "Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server." *Nucleic Acids Res* 42(Web Server issue) S. W320 (2014)

- Roche* "High Pure PCR Cleanup Micro Kit " Handbuch Mannheim, Deutschland (2008)
- Roche* "Genopure Plasmid Maxi Prep Kit." Handbuch Mannheim (2010a)
- Roche* "High Pure Plasmid Isolation Kit." Handbuch Mannheim (2010b)
- Roche* "High Pure Plasmid Isolation Kit." Handbuch Mannheim, Deutschland (2011)
- Roodyn DB & Mandel HG* "A simple membrane fractionation method for determining the distribution of radioactivity in chemical fractions of *Bacillus cereus*." *Biochim Biophys Acta* 41 S. 80 (1960)
- Rössler C* "Vergleichende Charakterisierung der Substratspezifität L- und D-stereospezifischer Proteasen." Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (2011)
- Sacchi S, Rosini E, Pollegioni L & Molla G* "D-amino acid oxidase inhibitors as a novel class of drugs for schizophrenia therapy." *Curr Pharm Des* 19(14) S. 2499 (2013)
- Sajiki H* "Selective-Inhibition of Benzyl Ether Hydrogenolysis with Pd/C Due to the Presence of Ammonia, Pyridine or Ammonium Acetate." *Tetrahedron Lett* 36(20) S. 3465 (1995)
- Sakai K, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Tashiro K, Iwatsubo T, et al.* "D-Aspartic acid localization during postnatal development of rat adrenal gland." *Biochem Biophys Res Commun* 235(2) S. 433 (1997)
- Sargent F, Stanley NR, Berks BC & Palmer T* "Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein." *J Biol Chem* 274(51) S. 36073 (1999)
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA & Charlier P* "The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis." *FEMS Microbiol Rev* 32(2) S. 234 (2008)
- Schechter I & Berger A* "On the size of the active site in proteases. I. Papain." *Biochem Biophys Res Commun* 27(2) S. 157 (1967)
- Scheffers DJ & Pinho MG* "Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies." *Microbiol Mol Biol Rev* 69(4) S. 585 (2005)
- Schellenberger A* "Enzymkatalyse." Springer Verlag 1. Auflage S. (1989)
- Schellenberger V, Jakubke HD, Zapevalova NP & Mitin YV* "Protease-catalyzed peptide synthesis using inverse substrates: the influence of reaction conditions on the trypsin acyl transfer efficiency." *Biotechnol Bioeng* 38(1) S. 104 (1991)
- Schellenberger V, Turck CW & Rutter WJ* "Role of the S' subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin,  $\alpha$ -lytic protease, and cercarial protease from *Schistosoma mansoni*." *Biochemistry* 33(14) S. 4251 (1994)
- Schieber A, Bruckner H & Ling JR* "GC-MS analysis of diaminopimelic acid stereoisomers and amino acid enantiomers in rumen bacteria." *Biomed Chromatogr* 13(1) S. 46 (1999)
- Schoenheimer R* "The the dynamic state of body constituents." (1946)

- Schofield CJ, Baldwin JE, Byford MF, Clifton I, Hajdu J, Hensgens C & Roach P* "Proteins of the penicillin biosynthesis pathway." *Curr Opin Struct Biol* 7(6) S. 857 (1997)
- Schuler B & Eaton WA* "Protein folding studied by single-molecule FRET." *Curr Opin Struct Biol* 18(1) S. 16 (2008)
- Schwert GW & Takenaka Y* "A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin." *Biochim Biophys Acta* 16(4) S. 570 (1955)
- Shao J & Tam JP* "Unprotected Peptides as Building-Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages." *J Am Chem Soc* 117(14) S. 3893 (1995)
- Shapira R, Austin GE & Mirra SS* "Neuritic plaque amyloid in Alzheimer's disease is highly racemized." *J Neurochem* 50(1) S. 69 (1988)
- Sharma K, Babu PV, Sasidhar P, Srinivas VK, Mohan VK & Krishna E* "Recombinant human epidermal growth factor inclusion body solubilization and refolding at large scale using expanded-bed adsorption chromatography from *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* 60(1) S. 7 (2008)
- Sifferd RH & du Vigneaud V* "A new synthesis of carnosine, with some observations on the splitting of the benzyl group from carbobenzoxy derivatives and from benzylthio ethers." *J Biol Chem* 108(3) S. 753 (1935)
- Silvaggi NR, Josephine HR, Kuzin AP, Nagarajan R, Pratt RF & Kelly JA* "Crystal structures of complexes between the R61 DD-peptidase and peptidoglycan-mimetic  $\beta$ -lactams: a non-covalent complex with a "perfect penicillin"." *J Mol Biol* 345(3) S. 521 (2005)
- Simon AH, Liebscher S, Aumuller TH, Treblow D & Bordusa F* "Application of a Dual Internally Quenched Fluorogenic Substrate in Screening for D-Arginine Specific Proteases." *Front Microbiol* 10 S. 711 (2019)
- Simonen M & Palva I* "Protein secretion in *Bacillus* species." *Microbiol Rev* 57(1) S. 109 (1993)
- Skala W, Utschneider DT, Magdolen V, Debela M, Guo S, Craik CS, Brandstetter H, et al.* "Structure-function analyses of human kallikrein-related peptidase 2 establish the 99-loop as master regulator of activity." *J Biol Chem* 289(49) S. 34267 (2014)
- Smith GP* "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228(4705) S. 1315 (1985)
- Smith TJ, Blackman SA & Foster SJ* "Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions." *Microbiology* 146 ( Pt 2) S. 249 (2000)
- Sniegowski PD, Gerrish PJ & Lenski RE* "Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*." *Nature* 387(6634) S. 703 (1997)
- So JE, Kang SH & Kim BG* "Lipase-catalyzed synthesis of peptides containing D-amino acid." *Enz Micro Techn* 23(3-4) S. 211 (1998)
- Sorensen HP & Mortensen KK* "Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*." *Microb Cell Fact* 4(1) S. 1 (2005)



- Speicher KD, Gorman N & Speicher DW* "N-terminal sequence analysis of proteins and peptides." *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 11 S. Unit11 10 (2009)
- Sprinzi M* "Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector." *Trends Biochem Sci* 19(6) S. 245 (1994)
- Staudinger H & Meyer J* "On new organic phosphorus bonding III Phosphine methylene derivatives and phosphinimine." *Helv Chim Acta* 2 S. 635 (1919)
- Stratagene* "XL1-Blue Competent Cells " *Handbuch* (2004)
- Sugihara A, Shimada Y, Sugihara S, Nagao T, Watanabe Y & Tominaga Y* "A novel  $\alpha$ -amino-acid esterase from *Bacillus mycoides* capable of forming peptides of DD- and DL-configurations." *J Biochem* 130(1) S. 119 (2001)
- Tabor S & Richardson CC* "A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. 1985." *Biotechnology* 24 S. 280 (1992)
- Then RL, Charnas RL, Kocher HP, Manneberg M, Rothlisberger U & Stocker J* "Biochemical characterization of type A and type B  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae*." *Rev Infect Dis* 10(4) S. 714 (1988)
- Thormann M, Thust S, Hofmann HJ & Bordusa F* "Protease-catalyzed hydrolysis of substrate mimetics (inverse substrates): A new approach reveals a new mechanism." *Biochemistry* 38(19) S. 6056 (1999)
- Tipper DJ & Strominger JL* "Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 54(4) S. 1133 (1965)
- Tziridis A, Rauh D, Neumann P, Kolenko P, Menzel A, Brauer U, Ursel C, et al.* "Correlating structure and ligand affinity in drug discovery: a cautionary tale involving second shell residues." *Biol Chem* 395(7-8) S. 891 (2014)
- Uo T, Yoshimura T, Shimizu S & Esaki N* "Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*." *Biochem Biophys Res Commun* 246(1) S. 31 (1998)
- Urzhumtsev A, Tete-Favier F, Mitschler A, Barbanton J, Barth P, Urzhumtseva L, Biellmann JF, et al.* "A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil." *Structure* 5(5) S. 601 (1997)
- Usuki H, Uesugi Y, Arima J, Yamamoto Y, Iwabuchi M & Hatanaka T* "Engineered transaminopeptidase, aminolysin-S for catalysis of peptide bond formation to give linear and cyclic dipeptides by one-pot reaction." *Chem Commun* 46(4) S. 580 (2010)
- van't Hoff JH* "Über die zunehmende Bedeutung der anorganischen Chemie." 70. Versammlung der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte (1898)
- van den Berg JA, van der Laken KJ, van Ooyen AJ, Rennierts TC, Rietveld K, Schaap A, Brake AJ, et al.* "*Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin." *Biotechnology (N Y)* 8(2) S. 135 (1990)
- Varallyay E, Lengyel Z, Graf L & Szilagyi L* "The role of disulfide bond C191-C220 in trypsin and chymotrypsin." *Biochemical Biophysical Research Communication* 230(3) S. 592 (1997)

- Vasquez JR, Evin LB, Higaki JN & Craik CS "An Expression System for Trypsin." *J Cell Biochem* 39(3) S. 265 (1989)
- Velazquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S & Freire E "Isothermal titration calorimetry." *Current Protocols Cell Biology* Chapter 17 S. Unit 17 8 (2004)
- Vincze T, Posfai J & Roberts RJ "NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes." *Nucleic Acids Research* 31(13) S. 3688 (2003)
- Voet D & Voet J "Biochemistry, 3rd edition." John Wiley & Sons (2004)
- Vollmer W, Joris B, Charlier P & Foster S "Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases." *FEMS Microbiology Review* 32(2) S. 259 (2008)
- Vranova V, Zahradnickova H, Janous D, Skene K, Matharu A, Rejsek K & Formanek P "The significance of D-amino acids in soil, fate and utilization by microbes and plants: review and identification of knowledge gaps." *Plant and Soil* 354(1-2) S. 21 (2011)
- Wade D, Boman A, Wahlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG & Merrifield RB "All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides." *PNAS* 87(12) S. 4761 (1990)
- Wallace BA "Gramicidin channels and pores." *Annual Reviews Biophysics and Biophysical Chemistry* 19 S. 127 (1990)
- Wang JP, Mei H, Qian HL, Tang Q, Liu XC, Yu ZN & He J "Expression Profile and Regulation of Spore and Parasporal Crystal Formation-Associated Genes in *Bacillus thuringiensis*." *Journal of Proteome Research* 12(12) S. 5487 (2013)
- Wasserman SA, Daub E, Grisafi P, Botstein D & Walsh CT "Catabolic alanine racemase from *Salmonella typhimurium*: DNA sequence, enzyme purification, and characterization." *Biochemistry* 23(22) S. 5182 (1984)
- Waxman DJ & Strominger JL "Cephalosporin-sensitive penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* active in the conversion of [<sup>14</sup>C]penicillin G to [<sup>14</sup>C]phenylacetyl-glycine." *Journal of Biological Chemistry* 254(23) S. 12056 (1979)
- Wehofsky N, Kirbach SW, Haensler M, Wissmann JD & Bordusa F "Substrate mimetics and freezing strategy: a useful combination that broadens the scope of proteases for synthesis." *Org Lett* 2(14) S. 2027 (2000)
- Wehofsky N, Pech A, Liebscher S, Schmidt S, Komeda H, Asano Y & Bordusa F "D-amino acid specific proteases and native all-L-proteins: a convenient combination for semisynthesis." *Angew Chem-Ger Edit* 47(29) S. 5456 (2008)
- Wehofsky N, Thust S, Burmeister J, Klussmann S & Bordusa F "all-D-Polypeptides: novel targets for semisynthesis." *Angew Chem-Ger Edit* 42(6) S. 677 (2003)
- Weiss GA, Watanabe CK, Zhong A, Goddard A & Sidhu SS "Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning." *PNAS* 97(16) S. 8950 (2000)

- West JB & Wong CH "Use of Nonproteases in Peptide-Synthesis." *Tetrahedron Lett* 28(15) S. 1629 (1987)
- Wheeler D "Selecting the right protein-scoring matrix." *Current Protocols Bioinformatics* Chapter 3 Unit 3 5 (2002)
- Whitaker JR & Bender ML "Kinetics of Papain-Catalyzed Hydrolysis of Alpha-N-Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester and Alpha-N-Benzoyl-L-Argininamide." *Journal of the American Chemistry Society* 87 S. 2728 (1965)
- Wilson K "Preparation of Genomic DNA from Bacteria." *Current Protocols of Molecular Biology* Unit 2.4 (1997)
- Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, et al. "Overview of the CCP4 suite and current developments." *Acta Crystallographia D* 67(Pt 4) S. 235 (2011)
- Wintjens R, Wieruszeski JM, Drobecq H, Rousselot-Pailley P, Buee L, Lippens G & Landrieu I "1H NMR study on the binding of Pin1 Trp-Trp domain with phosphothreonine peptides." *Journal of Biological Chemistry* 276(27) S. 25150 (2001)
- Wood WB "Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA." *Journal of Molecular Biology* 16(1) S. 118 (1966)
- Wu P & Brand L "Resonance energy transfer: methods and applications." *Analytical Biochemistry* 218(1) S. 1 (1994)
- Wu Q, Soni P & Reetz MT "Laboratory evolution of enantiocomplementary *Candida antarctica* lipase B mutants with broad substrate scope." *Journal of the American Chemistry Society* 135(5) S. 1872 (2013)
- Wurm FM "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." *Nature Biotechnology* 22(11) S. 1393 (2004)
- Yoshimura T & Esak N "Amino acid racemases: functions and mechanisms." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96(2) S. 103 (2003)
- Young CL, Britton ZT & Robinson AS "Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications." *Biotechnology* 7(5) S. 620 (2012)
- Zellmeier S, Zuber U, Schumann W & Wiegert T "The absence of FtsH metalloprotease activity causes overexpression of the sigmaW-controlled pbpE gene, resulting in filamentous growth of *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* 185(3) S. 973 (2003)
- Zhao G, Yeh WK, Carnahan RH, Flokowitsch J, Meier TI, Alborn WE, Jr., Becker GW, et al. "Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and mechanistic implications in bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics." *Journal of Bacteriology* 179(15) S. 4901 (1997)
- Zhao H, Giver L, Shao Z, Affholter JA & Arnold FH "Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination." *Nature Biotechnology* 16(3) S. 258 (1998)

*Zheng H & Reetz MT* "Manipulating the stereoselectivity of limonene epoxide hydrolase by directed evolution based on iterative saturation mutagenesis." *Journal of the American Chemistry Society* 132(44) S. 15744 (2010)

*Zoldak G, Aumuller T, Lucke C, Hritz J, Oostenbrink C, Fischer G & Schmid FX* "A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases." *Biochemistry* 48(43) S. 10423 (2009)

# Anhang

## Inhaltverzeichnis Anhang

A.1 Geräteverzeichnis	ii
A.2 Chemischen Synthesen	iv
A.2.1 Aminosäuremethylester	iv
A.2.2 Peptidsynthesen	v
A.2.3 Analytik zu Bz-Gly-OGp	vi
A.2.4 Aminosäureamidsynthesen	vii
A.3 Molekularbiologischer Anhang	viii
A.3.1 Verwendete Oligonukleotide	viii
A.3.2 Übersicht über die generierten/verwendeten Konstrukte	xi
A.4 Bestimmung kinetischer Konstanten	xii
A.5 Firmenverzeichnis	xv
A6. Danksagung	xvi
A7. Addendum	xviii
A8. Lebenslauf	xxiii
A9. Publikationsliste	xxiv
A10. Eidstattliche Erklärung	xxv

## A.1 Geräteverzeichnis

Verwendung	Geräte und Bestandteile	Hersteller
Elektrophorese- Apparaturen	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad
	Energie: PowerPac Basic	Bio-Rad
Geldokumentation	Bio View UST-30M-8E	Biostep
	Software: argusX1 7.10.14	Biostep
	Dunkelhaube: DH-20	Biostep
	Kamera: EOS 550 D	Canon
	Drucker: P95 DE	Mitsubishi
Chromatographische Proteinreinigung	ÄKTA Prime plus	GE Healthcare
	Software: PrimeView 5.0	GE Healthcare
	Peristaltic Pump P1	Pharmacia
	Detektor: Uvicord SII	Pharmacia
	Plotter: REC 1	Pharmacia
	HiLoad 16/600 Superdex 75 PG (34 µm)	GE Healthcare
	Toyopearl SP-650M (65 µm)	Tosoh Bioscience
HPLC-System (analytisch)	Waters Breeze HPLC	Waters
	Software: Breeze 3.30	Waters
	Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm; 4 · 125 m)	Waters
	Autosampler: 717plus Autosampler	Waters
	Pumpe: 1525 Binary Solvent Pump	Waters
	Detektor: 2487 dual λ Absorbance Detector	Waters
	Spectra HPLC System	TSP
	Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm; 4 · 125 m)	Waters
	Autosampler: Autosampler 3000	TSP
	Pumpe: Pump2000	TSP
	Detektor: FL 3000/AS 3000	TSP
HPLC-System (präparativ)	Merck Hitachi HPLC	Merck
	Säule: LiChrosorb RP-8 (7 µm; 4,6 · 250 mm)	Merck
	Pumpe: L-2650 Intelligent Pump	Merck
	Detektor: L-4000 UV Detector	Merck
	Plotter: D-2500 Chromato-Integrator	Merck
Inkubator	Mini/50	Genlab
Inkubationsschüttler	HT Minitron	Infors AG
	Thermomixer comfort	Eppendorf
Lyophilisator	Alpha 2-4	Christ
	Ölpumpe: Chemie-Hybrid-Pumpe RC5	Vacuubrand

<b>Verwendung</b>	<b>Geräte und Bestandteile</b>	<b>Hersteller</b>
Massenspektrometer	Waters micromass ZQ	Waters
	Software: MassLynx 4.1	Waters
	Säule: X Bridge C8 (2,5 µm; 2,1 · 100 mm)	Waters
	Autosampler: 2767 Sample Manager	Waters
	Pumpe: 1525 Binary Solvent Pump	Waters
	Detektor: 2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters
	Ionenquelle: Elektrospray-Ionisation Massenanalysator: Single Quadrupol	
Peptidsynthesizer	Syroll	Multisyntech
Plattenleser	NOVOStar	BMGLabtech
	Software: NOVOStar 1.20-0	BMGLabtech
Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph
PCR-Cycler	Primus HT	Clemens
	Software: HT-Manager 1.21	Clemens
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo
	pH-Elektrode: InLab Routine	Mettler Toledo
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 efficient	Heidolph
Scanner	CanoScan LiDE 210	Canon
	Software: MP Navigator EX 4.02	Canon
Spektrophotometer	NanoPhotometer	Implen
	Messzelle: LG 100 UV-G	Implen
	Deckel: Lid Factor 10 (LP 1 mm)	Implen
	Luminescence Spectrometer LS50B Software: FL WinLab Version 2.01	PerinElmer PerinElmer
Ultraschall-Gerät	Digital Sonifier W-250 D	Branson
	Ultraschallsonde: 1/8 " Tapered Microtip	Branson
UPLC-System	Acquity Ultra Performance LC	Waters
	Software: MassLynx 4.1	Waters
	Säule: BEH300 C18 (1,7 µm; 2,1 · 50 mm)	Waters
	Autosampler: Sample Manager	Waters
	Pumpe: Binary Solvent Manager Detektor: TUV Detector	Waters Waters
Waagen	Analytic AC 210 S	Sartorius
	Laboratory LC 820	Sartorius
	XP56	Mettler Toledo
Zentrifugen & Rotoren	Avanti J-26 XP (Rotor JLA 8.1)	Beckman Coulter
	Biofuge fresco (Standard-Rotor)	Heraeus
	Megafuge 1.0 (Standard-Rotor)	Heraeus
	Optima L-90K Ultrazentrifuge (Rotor 70 Ti)	Beckman Coulter

## A.2 Chemischen Synthesen

### A.2.1 Aminosäuremethylester

Tab. A 1 Übersicht über die synthetisierten Aminosäuremethylester deren Ausbeute sowie kalkulierten Masse/Ladungsverhältnis  $m/z_{\text{calc}}$  und ermittelten Masse/Ladungsverhältnis  $m/z_{\text{det}}$

Aminosäuremethylester	Ausbeute (%)	$m_{\text{calc}}$	$m/z_{\text{det}}$
Bz-L-Ala-OMe	72%	207,09	208,4
Bz-L-Phe-OMe	75%	283,12	284,5
Bz-L-Ser-OMe	57%	223,08	224,3
Bz-L-His-OMe	61%	273,11	274,3
Bz-L-Met-OMe	72%	267,09	268,2
Bz-L-Val-OMe	34%	235,12	236,5
Bz-L-Pro-OMe	65%	233,11	234,4
Bz-L-Glu-OMe	21%	265,10	266,4
Bz-L-Arg-OMe	-*	292,15	293,7
Bz-L-Trp-OMe	43%	322,13	323,4
Bz-L-Tyr-OMe	64%	299,12	300,3
Bz-Gly-OMe	65%	193,07	194,2
Bz-D-Ala-OMe	56%	207,09	208,4
Bz-D-Phe-OMe	83%	283,12	284,5
Bz-D-Ser-OMe	41%	223,08	224,5
Bz-D-His-OMe	60%	273,11	274,3
Bz-D-Met-OMe	58%	267,09	268,1
Bz-D-Val-OMe	66%	235,12	236,2
Bz-D-Pro-OMe	73%	233,11	234,4
Bz-D-Glu-OMe	26%	265,10	266,4
Bz-D-Arg-OMe	50%	292,15	293,3
Bz-D-Trp-OMe	44%	322,13	323,4
Bz-D-Tyr-OMe	72%	299,12	300,3

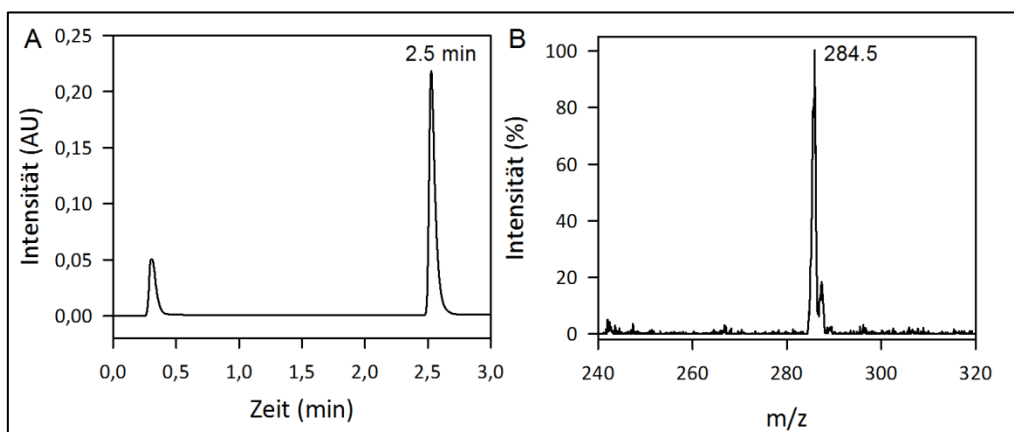


Abb. A. 1 HPLC-Chromatogramm (A) und Massenspektrum (B) für Aminosäuremethylester am Beispiel von Bz-D-PheOMe. / Linearer Gradient 0 auf 40 % ACN in 3 Minuten, Detektionswellenlänge 220nm



## A.2.2 Peptidsynthesen

Tab. A 2 Übersicht über die synthetisierten Peptide, deren Sequenz, Ausbeute sowie kalkulierten Masse/Ladungsverhältnis  $m/z_{\text{calc}}$  und ermittelten Masse/Ladungsverhältnis  $m/z_{\text{det}}$

Peptidsequenz	Ausbeute (%)	$m_{\text{calc}}$	$m/z_{\text{det}}$	Peptidsequenz	Ausbeute (%)	$m_{\text{calc}}$	$m/z_{\text{det}}$
<i>all</i> -L-H-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-OH	71,8	360,4	361,0	<i>all</i> -D-H- <b>Met</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	80,0	420,5	421,0
<i>all</i> -L- H- <b>Leu</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	68,5	402,5	403,0	<i>all</i> -D-H- <b>Asn</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	47,6	403,4	404,0
<i>all</i> -L-H- <b>Met</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	65,0	420,5	421,0	<i>all</i> -D-H- <b>Pro</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	62,7	386,4	387,0
<i>all</i> -L-H- <b>Pro</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	65,4	386,4	387,0	<i>all</i> -D-H- <b>Arg</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	67,4	445,5	446,0
<i>all</i> -L-H- <b>Arg</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	77,3	445,5	446,0	<i>all</i> -D-H- <b>Ser</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	47,5	376,4	377,0
<i>all</i> -L-H-Ala- <b>Gly</b> -Ala-Ala-Gly-OH	49,3	346,4	347,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Glu</b> -Ala-Ala-Gly-OH	33,4	418,4	419,0
<i>all</i> -L-H-Ala- <b>Met</b> -Ala-Ala-Gly-OH	55,0	420,5	421,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Phe</b> -Ala-Ala-Gly-OH	66,7	436,5	437,0
<i>all</i> -L-H-Ala- <b>Pro</b> -Ala-Ala-Gly-OH	62,7	386,4	387,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Gly</b> -Ala-Ala-Gly-OH	59,5	346,4	347,0
<i>all</i> -L-H-Ala-Ala- <b>Leu</b> -Ala-Gly-OH	81,5	402,5	403,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Leu</b> -Ala-Ala-Gly-OH	82,8	402,5	403,0
<i>all</i> -L-H-Ala-Ala- <b>Met</b> -Ala-Gly-OH	43,7	420,5	421,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Met</b> -Ala-Ala-Gly-OH	95,3	420,5	421,0
<i>all</i> -L-H-Ala-Ala- <b>Asn</b> -Ala-Gly-OH	47,6	403,4	404,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Asn</b> -Ala-Ala-Gly-OH	41,2	403,4	404,0
<i>all</i> -L-H-Ala-Ala- <b>Pro</b> -Ala-Gly-OH	41,4	386,4	387,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Pro</b> -Ala-Ala-Gly-OH	76,1	386,4	387,0
<i>all</i> -L-H-Ala-Ala- <b>Arg</b> -Ala-Gly-OH	71,4	445,5	446,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Arg</b> -Ala-Ala-Gly-OH	59,5	445,5	446,0
<i>all</i> -D-H- <b>Ala</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	56,3	360,4	361,0	<i>all</i> -D-H-Ala- <b>Ser</b> -Ala-Ala-Gly-OH	60,8	376,4	377,0
<i>all</i> -D-H- <b>Glu</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	57,8	418,4	419,0	<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Glu</b> -Ala-Gly-OH	67,1	418,4	419,0
<i>all</i> -D-H- <b>Phe</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	26,7	436,5	437,0	<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Phe</b> -Ala-Gly-OH	72,8	436,5	437,0
<i>all</i> -D-H- <b>Gly</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	87,1	346,4	347,0	<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Gly</b> -Ala-Gly-OH	85,6	346,4	347,0
<i>all</i> -D-H- <b>Leu</b> -Ala-Ala-Ala-Gly-OH	80,2	402,5	403,0	<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Leu</b> -Ala-Gly-OH	76,3	402,5	403,0

Peptidsequenz	Ausbeute (%)	m <sub>calc</sub>	m/z <sub>det</sub>	Peptidsequenz	Ausbeute (%)	m <sub>calc</sub>	m/z <sub>det</sub>
<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Met</b> -Ala-Gly-OH	68,7	420,5	421,0	<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Arg</b> -Ala-Gly-OH	37,7	445,5	446,0
<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Asn</b> -Ala-Gly-OH	65,6	403,4	404,0	<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Ser</b> -Ala-Gly-OH	58,6	376,4	377,0
<i>all</i> -D-H-Ala-Ala- <b>Pro</b> -Ala-Gly-OH	45,4	386,4	387,0				

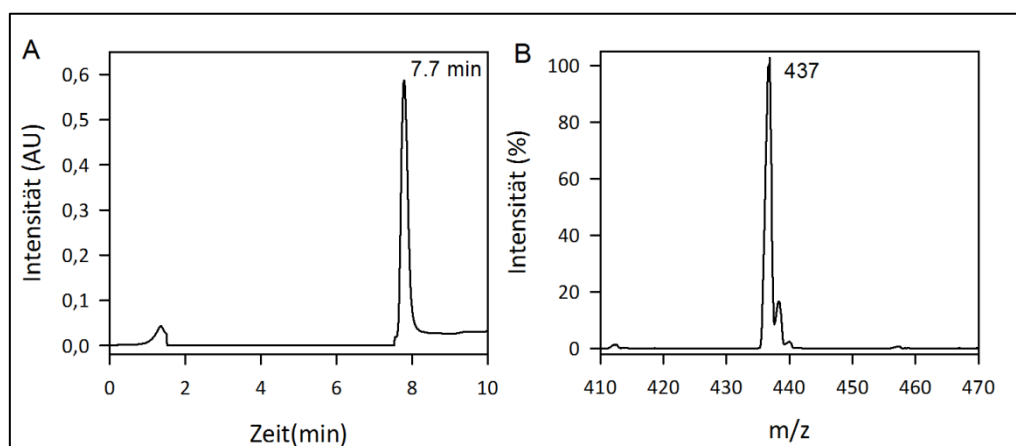


Abb. A. 2 HPLC-Chromatogramm (A) und Massenspektrum (B) für Peptide am Beispiel von *all*-L-H-Phe-Ala-Ala-Gly-OH. / Linearer Gradient 0 auf 50 % ACN in 10 Minuteb, Deteketionswellenlänge 220nm

### A.2.3 Analytik zu Bz-Gly-OGp

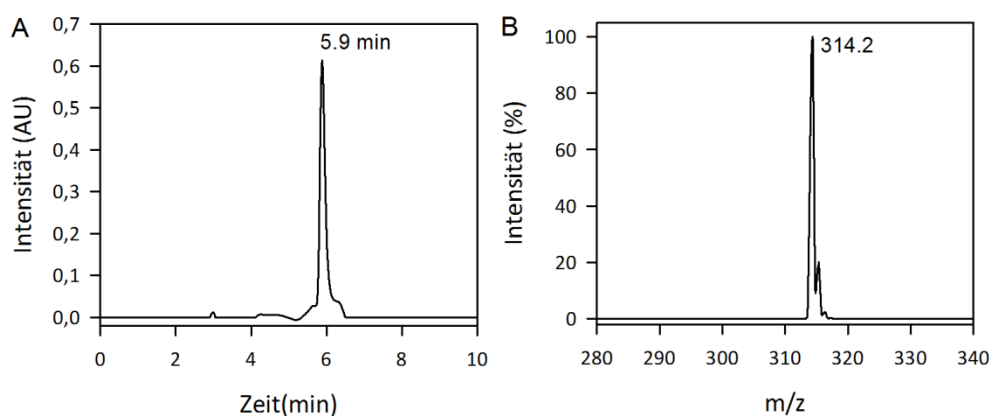
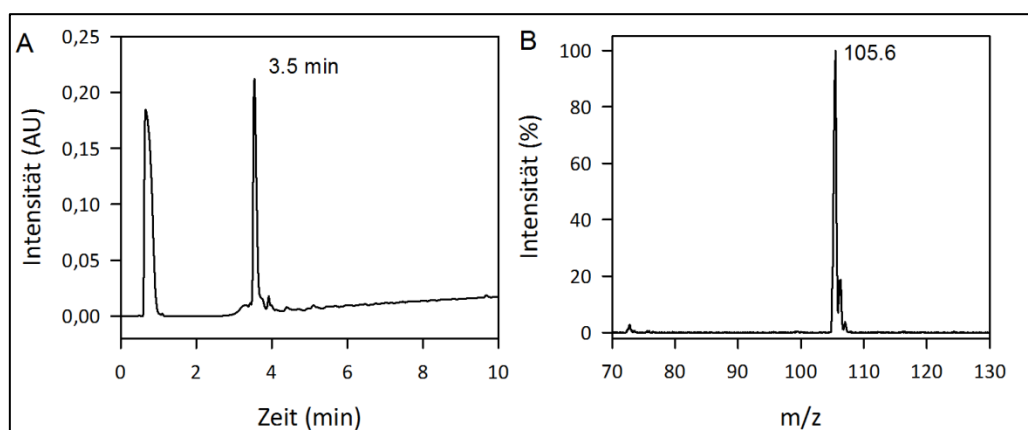


Abb. A. 3 HPLC-Chromatogramm (A) und Massenspektrum (B) von Bz-Gly-OGp. / Linearer Gradient 0 auf 50 % ACN in 10 Minuteb, Deteketionswellenlänge 254nm

### A.2.4 Aminosäureamidsynthesen

	Ausbeute	$m_{\text{calc}}$	$m/z_{\text{det}}$	Drehwert (22°C, 589nm)	
H-D-Glu-NH <sub>2</sub>	72,8	146,1	147,9	-10°	ddH <sub>2</sub> O
H-D-Met-NH <sub>2</sub>	87,6	148,2	149,8	+11°	MeOH
H-D-Asn-NH <sub>2</sub>	34,6	131,1	132,7	-18°	1M HCl
H-D-Arg-NH <sub>2</sub>	53,4	173,0	174,5	-14°	DMF
H-D-Ser-NH <sub>2</sub>	88,3	104,1	105,6	-7°	MeOH



**Abb. A. 4** HPLC-Chromatogramm (A) und Massenspektrum (B) für Aminosäureamide am Beispiel von Ser-NH<sub>2</sub>. / Linearer Gradient 0 auf 20 % ACN in 10 Minuteb, Detektionswellenlänge 220nm

## A.3 Molekularbiologischer Anhang

### A.3.1 Verwendete Oligonukleotide

**Tab. A 3 Allgemeine Oligonukleotide mit diversen Verwendungszwecken**

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Trypsin_S195A_for	5'-TGCCAGGGTGACGCTGGTGGCCCTGTG-3'	Generierung von SSAI-Trypsin
Trypsin_S195A_rev	5'-CACAGGGCCACCAGCGTCACCCTGGCA-3'	S195A
T7_for	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Sequenzierprimer <i>pET</i> Vektoren
<i>pYT_rev</i>	5'-GGAGCACTGTCCGACCGC-3'	Sequenzierprimer <i>pYT</i> Vektoren

**Tab. A 4 Oligonukleotidsequenzen zur Isolierung von Genen aus genomischer DNA von Mikroorganismen**

Name	Sequenz	Verwendungszweck
dHy_BC_for	5'-GACATATGAAAACACGTAGTCAAATTACATGTGC-3'	Isolation dHy aus <i>B. cereus</i>
dHy_BC_rev	5'-GTCTCGAGCTAC TGCTAAAT TCAGCAAGTAA-3'	
dHy_BT_for	5'-CAC ATATGAGTTCGTTACAAACAAGTAATCAA-3'	Isolation dHy aus <i>B. thuringiensis</i>
dHy_BT_rev	5'-GTCTCGAGCTACTTGCTAAATTCAGCAAGTAA-3'	

**Tab. A 5 Oligonukleotide zur Darstellung der Trypsingerüstvariante**

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Tn_SS_for	5'-TGTGAAGCCTCCTCCTCTGGAAAGATCACTGAC-3'	Darstellung der Trypsinvariante SSAI, sowohl in <i>pET-22b</i> als auch in <i>pST</i>
Tn_SS_rev	5'-GTCAGTGATCTTTCCAGAGGAGGAGGCTTCACAGTC-3'	
Tn_SSAI_for	5'-CTGACTGTGAAGCCTCCTCCTCTGCAATTATCACTG-3'	
Tn_SSAI_rev	5'-CAGACCATGTTGTGTCAGTGATAATTGCAGAG GAGGAG-3'	
<i>SacI_for</i>	5'-GGTCTGTAATGGAGAGCTCCAGGGCATTGTCTCCTG-3'	Konstruktion <i>SacI</i> – Schnittstelle
<i>SacI_rev</i>	5'-CAGGAGACAATGCCCTGGAGCTCTCCATTACAGACC-3'	
<i>BbvCI_for</i>	5'-AACATGGTCTGTGTTGGCTTCGCTGAGGGAGGCAA-3'	Konstruktion <i>BbvCI</i> – Schnittstelle
<i>BbvCI_rev</i>	5'-GCAGGAATCCTTGCCCTCCCTCAGCGAAGCCAACAC-3'	
<i>AvaI_1v2_for</i>	5'-CTATGGCTGTGCCCTGCCCGATAACCCTGGTGTGTA-3'	Konstruktion <i>AvaI</i> – Schnittstelle
<i>AvaI_1v2_rev</i>	5'-TACACACCAGGGTTATCGGGCAGGGCACAGCCATA-3'	
<i>AvaI_2v2_for</i>	5'-GCTGTGCCCTGCCAGAGAACCCTGGTGTGTACAC-3'	
<i>AvaI_2v2_rev</i>	5'-GTGTACACACCAGGGTTCTCTGGCAGGGCAC-3'	
<i>AvaI_3v3_for</i>	5'-AACTAGAAGCTTGC GGCCGCACTGGAGCACCACCA-3'	
<i>AvaI_3v3_rev</i>	5'-AGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCCAGTGGCCGCA-3'	
<i>AvaI_for</i>	5'-TTGGTGTACACACCAGGGTTCTCGGGCAGGGCACA-3'	
<i>AvaI_rev</i>	5'-GGCTATGGCTGTGCCCTGCCCGAGAACCCTGGTGTG-3'	

Tab. A 6 Oligonukleotide zur Darstellung der Trypsinbibliotheken

Name	Sequenz	Verwendungszweck
<i>Loop_189_for</i>	5'-CTTCGCTGAGGGAGGC-3'	Generierung der Bibliothek 189
<i>Loop_189_rev</i>	5'-CTGGAGCTCTCCATTACAG-3'	
<i>Loop_189_Ins</i> <sup>10</sup>	5'-CTTCGCTGAGGGAGGCAAGNNKNNKTGCNNKGGTGACTC TGGTGGCCCTGTGGTCTGTAATGGAGAGAGCTCCAG-3'	
<i>Loop_215_for</i>	5'-TGGAGAGCTCCAGGGC-3'	Generierung der Bibliothek 215
<i>Loop_215_rev</i>	5'-CAGGGTTCTCGGGCAG-3'	
<i>Loop_215_Ins</i>	5'-TGGAGAGCTCCAGGGCATTNNKNNKTGGNNKNNKNNKTG TNNKCTGCCCGAGAACCCTG-3'	
<i>Loop_226_for</i>	5'-GCGCTGCCCGAGAAC-3'	Generierung der Bibliothek 226
<i>Loop_226_rev</i>	5'-CAGCAATTGTGCTCTGAATCC-3'	
<i>Loop_226_Ins</i>	5'-GCGCTGCCCGAGAACNNKNNKNNKNNKACCAAGGTCTGC AACTATGTGGACTGGATTCAGGACACAATTGCTG-3'	

		2. Position				
		A	C	G	T	
1. Position	A	Asn (N)	Thr (T)	Ser (S)	Ile (I)	T
		Lys (K)	Thr (T)	Arg (R)	Met (M)	G
	C	His (H)	Pro (P)	Arg (R)	Leu (L)	T
		Gln (Q)	Pro (P)	Arg (R)	Leu (L)	G
	G	Asp (D)	Ala (A)	Gly (G)	Val (V)	T
		Glu (E)	Ala (A)	Gly (G)	Val (V)	G
	T	Tyr (Y)	Ser (S)	Cys (C)	Phe (F)	T
		Stopp	Ser (S)	Trp (W)	Leu (L)	G
		3. Position				

Abb. A. 5 Darstellung der zu erwartenden Aminosäuren unter Verwendung von NNK-Oligonukleotiden<sup>11</sup>

<sup>10</sup> Unterstrichen sind die Schnittstellen in den jeweiligen Sequenzen der Bereiche des *Loops* 189 (*BbvCI*, *SacI*), des *Loops* 215 (*SacI*, *AvaI*) und des *Loops* 226 (*AvaI*, *MfeI*)

<sup>11</sup> Nach Hoffmann, A. (2011), „Erzeugung und Charakterisierung Ubiquitin-basierter Bindeproteine“, Promotion, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

**Tab. A 7 Oligonukleotide zur Darstellung von gescreenten Trypsinvarianten**

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Q5_REYF_for	5'-TACTTTGGTGACTCTGGTGGCCCT-3'	Darstellung der Trypsinvariante REYF
Q5_REYF_rev	5'-TTCACGCTTGCCTCCCTCTAGGAAGC-3'	
Q5-VVDG_for	5'-GACGGGGGTGACTCTGGTGGCCCT-3'	Darstellung der Trypsinvariante VVDG
Q5_VVDG_rev	5'-AACAACTTGCCTCCCTCTAGGAAGC-3'	
Q5_PCPG_for	5'-CCCGGGGTGACTCTGGTGGCCCT-3'	Darstellung der Trypsinvariante PCPG
Q5_PCPG_rev	5'-GCAAGGCTTGCCTCCCTCTAGGAAGC-3'	
Q5_GFTT_for	5'-ACCACGGGTGACTCTGGTGGCCCT-3'	Darstellung der Trypsinvariante GFTT
Q5_GFTT_rev	5'-GAAACCTTGCCTCCCTCTAGGAAG-3'	
Q5_ACMN_for	5'-GCAAGCCTTGCCTCCCTCTAGGAAGC-3'	Darstellung der Trypsinvariante ACMN
Q5_ACMN_rev	5'-ATGAACGGTGACTCTGGTGGCCCT-3'	
Q5_PLCV_for	5'-TGC GTGGTGACTCTGGTGGCCCT-3'	Darstellung der Trypsinvariante PLCV
Q5_PLCV_rev	5'-TAAAGCTTGCCTCCCTCTAGGAAG-3'	

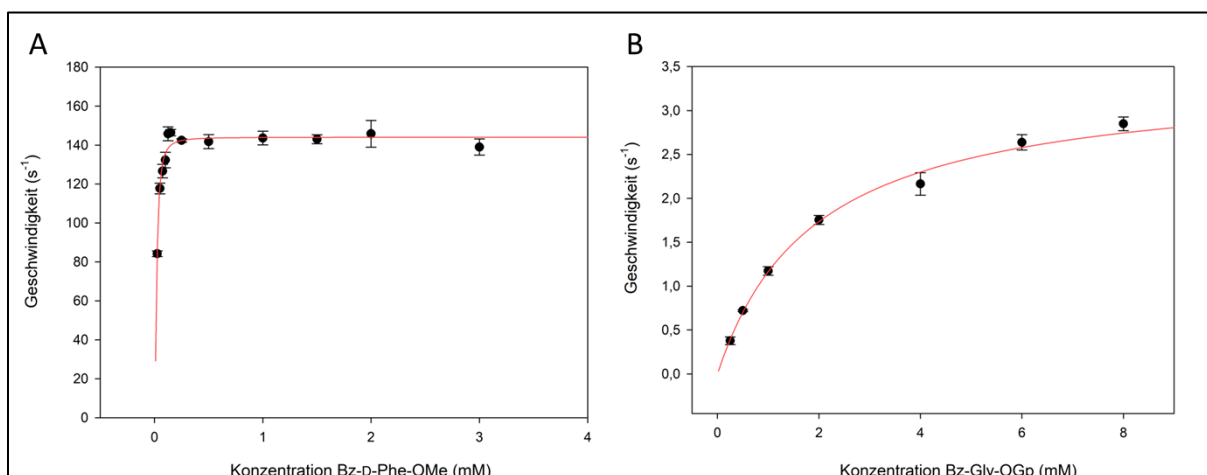
### A.3.2 Übersicht über die generierten/verwendeten Konstrukte

Folgend ist eine Listung aller im Rahmen dieser Arbeit generierten Plasmidkonstrukte, sowie deren Resistenz und der Ursprung aufgeführt.

<b>Konstrukt</b>	<b>Vektor</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Ursprung</b>
<i>B. cereus</i> DHy	<i>pET 28a</i>	<i>Kan</i>	<i>diese Arbeit</i>
	<i>pET 30a</i>	<i>Kan</i>	<i>diese Arbeit</i>
<i>B. thuriengiensis</i> DHy	<i>pET 28a</i>	<i>Kan</i>	D. Treblow
Wildtyptrypsin <sup>12</sup>	<i>pST</i>	<i>Amp</i>	L. Hedstorm
	<i>pYT</i>	<i>Amp, LEU, URA</i>	L. Hedstrom
SSAI-Trypsin	<i>pET 22b</i>	<i>Amp</i>	S. Liebscher
	<i>pST</i>	<i>Amp</i>	<i>diese Arbeit</i>
	<i>pYT</i>	<i>Amp, LEU, URA</i>	<i>diese Arbeit</i>
SSAI-Trypsin S195A	<i>pET 22b</i>	<i>Amp</i>	S. Liebscher
Bibliothek 189	<i>pET 22b</i>	<i>Amp</i>	<i>diese Arbeit</i>
Bibliothek 215	<i>pET 22b</i>	<i>Amp</i>	<i>diese Arbeit</i>
Bibliothek 226	<i>pET 22b</i>	<i>Amp</i>	<i>diese Arbeit</i>
SSAI-REYF-Trypsin	<i>pST</i>	<i>Amp</i>	G. Höger
	<i>pYT</i>	<i>Amp, LEU, URA</i>	<i>diese Arbeit</i>
SSAI-PCPG-Trypsin	<i>pST</i>	<i>Amp</i>	G. Höger
	<i>pYT</i>	<i>Amp, LEU, URA</i>	G. Höger
SSAI-VVDG-Trypsin	<i>pST</i>	<i>Amp</i>	G. Höger
	<i>pYT</i>	<i>Amp, LEU, URA</i>	<i>diese Arbeit</i>
SSAI-ACMN-Trypsin	<i>pST</i>	<i>Amp</i>	<i>diese Arbeit</i>
	<i>pYT</i>	<i>Amp, LEU, URA</i>	<i>diese Arbeit</i>
SSAI-GFTT-Trypsin	<i>pST</i>	<i>Amp</i>	<i>diese Arbeit</i>
	<i>pYT</i>	<i>Amp, LEU, URA</i>	<i>diese Arbeit</i>

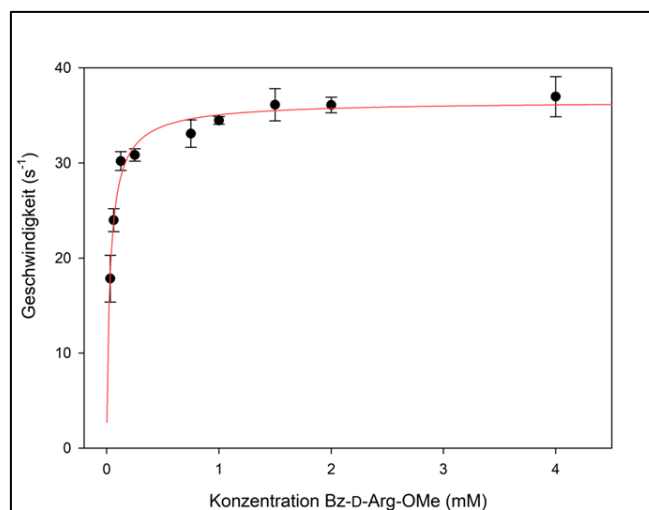
<sup>12</sup> Alle Trypsinvarianten haben den Ursprung in anionischem Rattentrypsin II

## A.4 Bestimmung von kinetischen Konstanten



**Abb. A. 5 Bestimmung der kinetischen Konstanten der ADP.**

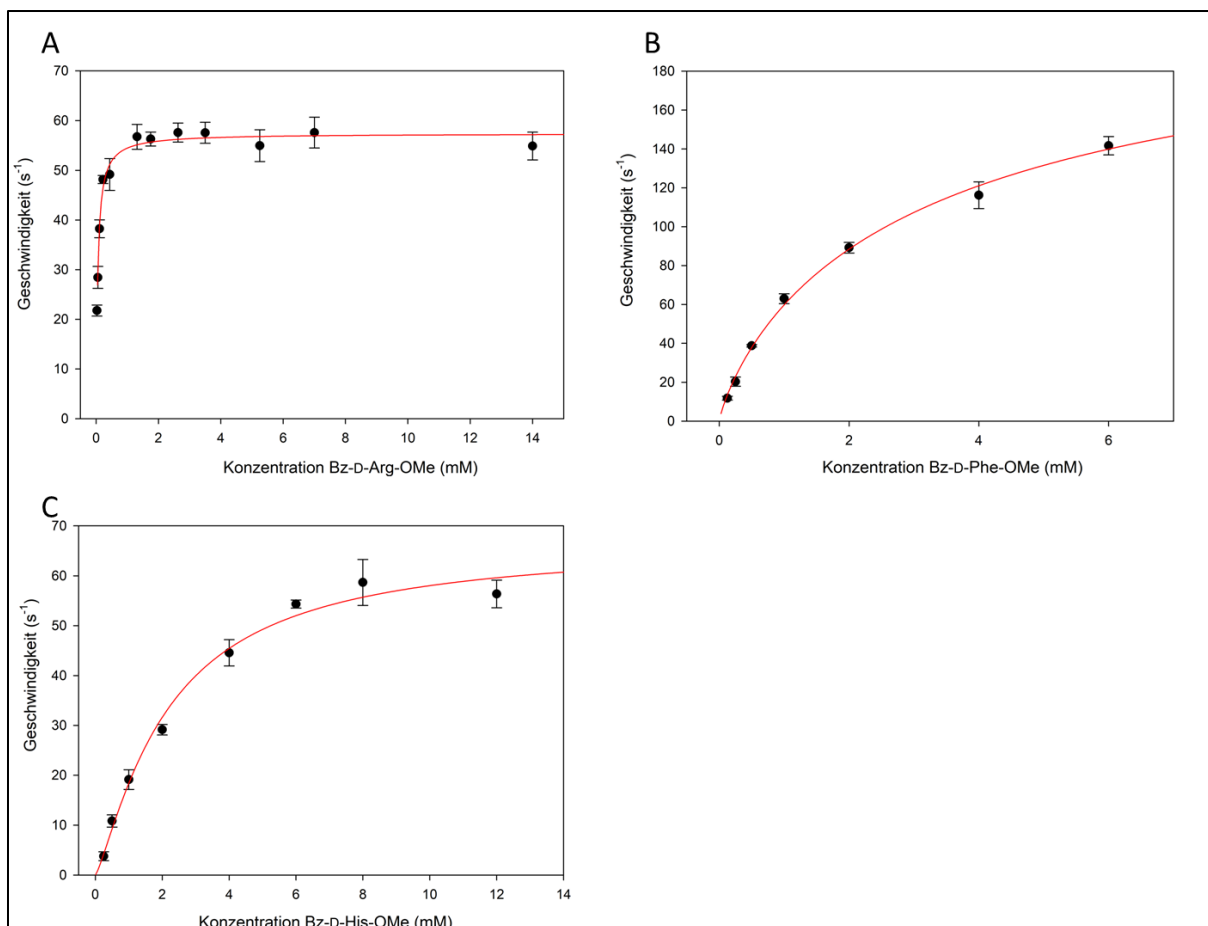
Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,01 – 5  $\mu$ M  $\alpha$ Hy, 12,5 nM – 8 mM A: Bz-D-Phe-OMe / B: Bz-Gly-OGp / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC (variable Gradienten, 3 Min,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug < 5 %.



**Abb. A. 6 Bestimmung der kinetischen Konstanten von Bz-D-Arg-OMe der BC<sub>α</sub>Hy.**

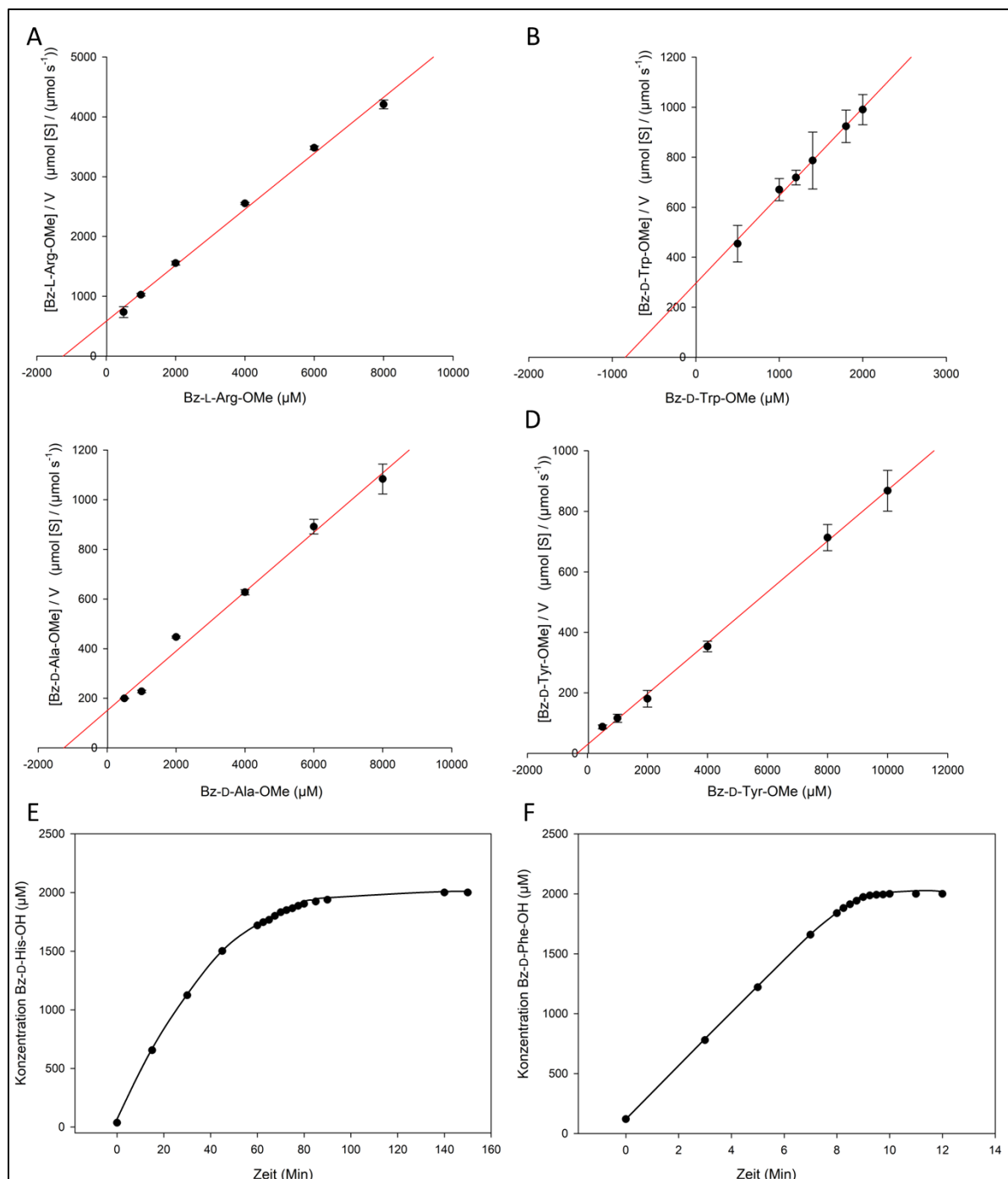
Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,01 – 5  $\mu$ M  $\alpha$ Hy, 12,5 nM – 4 mM Bz-D-Arg-OMe, / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC (5% => 60% ACN- Gradienten, 3 Min,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug < 5 %.





**Abb. A.7 Bestimmung der kinetischen Konstanten  $\rho_{Hy}$ .**

Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 8,0), 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,01 – 5  $\mu$ M  $\rho_{Hy}$ , 12,5 nM – 14 mM Bz-D-Xaa-OMe (A: D-Arg, B: D-Phe, C: D-His), / Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels UPLC (variable Gradienten, 3 Min,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug < 5 %.



**Abb. A.8 Abschätzung der kinetischen Konstanten von SSAI-GFTT-Trypsin.**

Reaktionsbedingungen: Reaktionsbedingungen: 100 mM HEPES (pH 7,8), 100 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 °C, 1 % (v/v) DMF, 0,05–10 mM Bz-D/L-Xaa-OMe (A: L-Arg, B: D-Trp, C: D-Ala, D: D-Tyr, E: D-His, F: D-Phe), 2,2–50  $\mu\text{M}$  SSAI-GFTT-Trypsin / Die Analyse der Reaktionen erfolgten mittels UPLC (Gradient: 10 auf 50 % ACN, 3 min,  $\lambda$  254 nm). Die Messabweichung betrug < 15 %. / Die Auswertung der Sekundärgraphen sowie die daraus erfolgten Ableitungen der kinetischen Konstanten erfolgte nach entweder Linearisierung (*Hanes-Woolf*, A-D) oder direkt *linear fit* (E, F). verschiedenen Methoden. <sup>b</sup> 5 % (v/v) DMF wurden verwendet.

## A.5 Firmenverzeichnis

AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Bachem AG	Bubendorf, Schweiz
Beckman-Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
BioRad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Biostep GmbH	Jahnsdorf, Deutschland
Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
BMG LABTECH GmbH	Ortenberg, Deutschland
Canon Deutschland GmbH	Krefeld, Deutschland
Carl Roth GmbH	Karlsruhe Deutschland
Clemens GmbH	Waldhüttelbrunn, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
Fluka Chemie AG	Steinheim, Deutschland
GE Healthcare GmbH	München, Deutschland
Genelab Limited	Cheshire, England
Heraeus Holding GmbH	Karlsruhe, Deutschland
IMPLEN GmbH	München, Deutschland
Infors AG	Bottmingen-Basel, Schweiz
Invitrogen GmbH	Karlsruhe, Deutschland
IRIS-Biotech GmbH	Marktredwitz, Deutschland
LGC Genomics GmbH	Berlin, Deutschland
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Ddeutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Millipore Corporate	Billerica Massachusetts, USA
MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
MWG Biotech AG	Ebersberg, Deutschland
New England Biolabs (NEB)	Frankfurt am Main, Deutschland
NovaBiochem	Bad Soden, Deutschland
ORPEGEN Pharma	Heidelberg, Deutschland
Perkin-Elmer Waltham	Massachusetts, USA
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Roche Diagnostic GmbH	Mannheim, Deutschland
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham Massachusetts, USA
Thermo Separation Products AG	Allschwil, Schweiz
TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Trentec Analysentechnik	Gerlingen, Deutschland
Waters GmbH	Eschborn, Deutschland
Zymo-Research	Glasgow, Schottland

## A6. Danksagung

Liebe Leser:innen dieser Arbeit,

an diesem letzten Punkt der Abfassung möchte ich gerne ein großes Dankeschön sagen. An alle, die mich während meiner Zeit in der **AG Bordusa** moralisch, materiell, ablenkend, spirituell (Dark Voodoo), inspirierend und natürlich auch finanziell unterstützt haben. In erster Linie danke ich dabei meinen Doktorvater Prof. Dr. **Frank Bordusa** für die Überlassung des interessanten Themas und die schöne Zeit, die ich bei ihm in der Arbeitsgruppe verbringen durfte. Unvergessen sind all die Fortschrittsberichte, welche ich bei ihm halten durfte und an deren Ende ich mich (ehrlicherweise) meist schlauer und motivierter fühlte. Denn genau aus dieser Kritik, den steten Anregungen und Weisheiten konnte ich viele Lehren und Schlüsse ziehen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Mir unvergessen ist dabei sein wohl wichtigster, eher beiläufig gegebener Ratschlag, welchen ich ihnen, lieber Leser, gerne weitergeben möchte: „Nimm dir mit etwas Abstand noch einmal deine Daten vor, du wirst dabei vielleicht das Ein oder Andere entdecken, was dir beim ersten Mal unwichtig erschien. Aber genau mit diesen Entdeckungen kannst du vielleicht etwas interpretieren, was du jetzt nicht verstehst.“ Ein weiterer großer Dank geht an meine praktische Betreuerin **Dr. Sandra Liebscher**. Nicht nur während meiner Diplomarbeit hat sie mich mit offen Armen & einem Eichhörnchen empfangen, sondern hat mich dann auch noch während der anschließenden Promotion betreut und in neue Dinge eingewiesen. Ich danke ihr auch für all die Vorarbeit, die sie geleistet hat und ohne die der evolutionäre Ansatz wohl nur ein gescheiterter Versuch geblieben wäre.

Neben diesen beiden wohl wichtigsten Personen danke ich auch unseren Chemikern. Allen voran Dr. **Andreas „Meister“ Pech**, der mir mit Engelsgeduld in allen Fragen, die ich zu Synthesen hatte, mit Rat und Tat beiseite stand und ohne den wohl die Syntheseausbeuten nur bei der Hälfte der hier in der Arbeit angegebenen lägen. Auch möchte ich ihm für das Korrekturlesen und die lustigen Stunden außerhalb des Labors (unvergessen der Volkspark und eine Weihnachts-/Geburtstagfeier) danken. Aus chemischer Sicht bin ich aber auch Dr. **Tobias Aumüller**, dessen geniale Idee, ein PPLase-Substrat zur Detektion von DSP zu verwenden, sich als goldrichtig erwies; Dr. **Bianca Hartrodt**, die unzählige Erst- und Zweitsynthesen für mich und meine Helferlein übernommen hat und die mich in ihrem Labor aufgenommen hat (Entschuldigung für die häufige Unordnung unter dem Abzug an dieser Stelle); Dr. **Christoph Meyer**, der unzählig viele Stunden in die Synthese des Blaumach-Substrates verwendet hat und den guten Seelen der Chemiker – **Karin Jentsch** und **Steffi Kaufmann** – zu Dank verpflichtet.

Ein weiteres Dankeschön geht an die MoBi-Fraktion. Allen voran meiner guten Fee im Labor **Christa Langer**. Wir hatten eine schöne geteilte Zeit miteinander und viel von mir angerichtetes Chaos, das sie zumeist ohne Murren beseitigt hat. Ohne ihren unermüdlichen Einsatz wären so viele Dinge nicht möglich gewesen – da ich weiß, dass sie weiß, was ich meine, sage ich einfach (und ich habe es bestimmt zu selten gesagt): Dankeschön. Neben ihr sind natürlich auch die anderen zu erwähnen, die da wären **Dr. Markus Böhme** und **Réne Wartner**, die mich im Abenteuer TrypCo begleiteten. Außerdem danke ich Dr. **Lars „Bärchen“ Franke**, der sich in die Enzymkinetik der Proteasen eingefuchst hat und der mir so manchen Effekt aus seiner Sicht interpretiert hat und damit dazu beigetragen hat, DD-Peptidasen ein wenig besser zu verstehen. Außerdem gebührt Prof. Dr.

**Frank Sargent & Prof. Dr. Tracy Palmer** für die Überlassung einiger Stämme und eines nice & comfy Schreibplatzes sowie Dr. **Adam Ostrowski** für die Übermittlung eines einfachen Fraktionierungsprotokolls für Bacilli, Dr. **Angelika Schierhorn** für die N-terminale Fragmentierung der dHy und Dr. **Carmen Mrestani-Claus** für die NMR-Analyse einiger Substrate mein Dank.

Des Weiteren danke ich allen, welche an der Kristallisation beteiligt waren. Allen voran Prof. Dr. **Milton T. Stubbs**, dessen Geräte und Messzeiten ich zur Genüge nutzen konnte sowie Dr. **Michael Schöpfel** der maßgeblich an der Strukturauflösung der dHyI und dHyIII (oder war es IV?) beteiligt war (Daten nicht gezeigt ☺) und mit dem ich einige lustige Abende (Regensburg calling/Fiddler) verbringen durfte. Auch sei an dieser Stelle **Ariunkhur Sharkhuukhen** gedankt, welche die Kristallisationsversuche und auch Aufklärung einiger Trypsinvarianten begleitet hat.

Und nun sind noch einige Dankesworte an die Drolle gerichtet. Allen voran **Dennis Treblow**, der die Geschichte der dHys in einem gegenseitigen Nehmen ;) und Nehmen mitgeprägt hat, der immer und stets irgendwie die verfluchte UPLC zum Laufen bekommen hat und dessen sinnlose *All-In*-Rufe in unzähligen Pokerabenden mich zum Wahnsinn trieben. Ebenfalls ein Dank gebührt meinen kleinen Schergen, deren Arbeiten und initialen Schritte ich auf dem wissenschaftlichen Feld betreue durfte und ohne deren kritisches und unkonventionelles Denken sowie deren unermüdlichen Fleiß so einiges Resultat nicht möglich gewesen wäre. Seid gewiss, ich verfolge immer noch eure Schritte auf dem Gebiet der Biochemie und es erfüllt mich mit Stolz zu sagen: „Ich hatte das Vergnügen mit euch zu arbeiten!“ Danke an Dr. **Philip Lössl** (mein Erster und der mir gezeigt hat, dass Betreuen Spaß macht), Dr. **Claudia „Claudi“ Rössler** (meine Synthesefee, ohne dich hätten wir nur einen Teil der Bibliotheken), Dr. **Geralin „Dude“ Höger** (KinetikpHuchs – Ja mit pH?) und **Fred Armbrust** (Du Fleißbolzen unterm Herrn hast nahezu alle Restfragen zu SSAI-Trypsin geklärt). Daneben danke ich **Katharina „Kat van B“ Becker** (dHy II-IV und das Verständnis dieser Enzyme im Allgemeinen) und **Falko „mit K“ Jähnert** (endlich mal einer der Bioinformatik liebt und du hast mir einige der unangenehmsten, weil markerschütternden und kritischsten Fragen gestellt - aber genau das ist wichtig! – Behalte diese Eigenschaft und hege und pflege sie. Außerdem hast du dir diese Arbeit zur Korrektur vorgenommen).

*Last but not least* danke ich allen anderen Wegbegleitern, die, wenn auch eher weniger wissenschaftlich, dafür mehr zwischenmenschlich durch Ablenkung, Ausflüge, Unternehmungen und Zeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Diese sind **Katja, Anne, Alex, Mario** (Mettwoch & Dönerstage), **André** (Käffchen am Wochenende und der HFC steigt niemals auf) und allen weiteren hier nicht namentlich genannten Freunden.

Die finalen Worte dieser Danksagung möchte ich meiner Familie widmen: meinen **Eltern** die mich immer unterstützt haben, meinen **Großeltern** und meiner **Schwester** – einfach nur Danke, dass ihr da wart. Und letztendlich Dr. Constanze „**Conny**“ Pinske – wärst du nicht da gewesen in all der Zeit, hättest du mich nicht immer wieder auf den Weg gebracht, hättest du nicht gesagt: probiere mal dies und das, hättest du nicht Korrektur gelesen, hättest du nicht... (Ich könnte diese Liste ewig fortführen) – ich wäre sonst wo. Ich DANKE DIR einfach FÜR ALLES.

## A7. Addendum

Im Zuge der vorliegenden schriftlichen Abfassung habe ich – zum Teil in Kooperation mit Mitarbeiter:innen der Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie – mehrere Graduierungsarbeiten zur Erlangung der akademischen Grade Diplom, Bachelor bzw. Master im Fachbereich Biochemie der naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg betreut. Dies betrifft sowohl den praktischen Zeitraum dieser Arbeit von Oktober 2008 bis Dezember 2014 als auch den folgenden Zeitraum von Januar 2015 bis Oktober 2021. An dieser Stelle sei vor allem der Biopharma Translationsinstitut Dessau Forschungs GmbH und der Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie gedankt, welche mir im letzteren Zeitraum die Zeit und auch Ressourcen zur Verfügung stellten, um diese Forschungsarbeiten zu betreuen.

Einige Teilergebnisse dieser Arbeiten wurden in der vorliegenden schriftlichen Abfassung genutzt und sind entsprechend markiert. Die folgende Listung umfasst diese und eine Auswahl an themennahen Arbeiten, den Zeitpunkt der Einreichung sowie etwaige weitere Betreuer und fasst die wichtigsten Ergebnisse der jeweiligen Arbeiten zusammen. Eine Einsicht der Graduierungsarbeiten kann im Archiv des Institutes für Biochemie der naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgenommen werden.

### ***Studien zu Trypsin und Trypsinvarianten***

**2014** „Studien zur Verifizierung eines Screeningsystems zur Generierung D-stereospezifischer Trypsin-Varianten“ (Masterarbeit, *Geralin Höger*)<sup>13</sup>

Ziel der Studien war eine kinetische Untersuchung der Bibliotheksausgangsvariante SSAI-Trypsin im Vergleich zu WT-Trypsin. Es konnte festgestellt werden, dass der SSAI-Loop einen deutlichen aktivitätsmindernden Effekt im Vergleich zu WT-Trypsin bewirkt. Dabei ist der Effekt im Fall von Säureamid-Bindungshydrolysen deutlicher stärker ausgeprägt als im Fall von Esterhydrolysen. Damit einher geht eine deutliche Minimierung autohydrolytischer Prozesse, sowie eine zu vermutende verminderte Zytotoxizität während der Biosynthese aktiver Trypsinvarianten, was eine potenzielle Verwendung von SSAI-Trypsin zur Generierung neuer Spezifitäten prinzipiell erlaubt.

**2014** „Studien zur Evaluierung des synthetischen Potentials ausgewählter Trypsinvarianten“ (Bachelorarbeit, *Fred Armbrust*)

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Evaluierung des synthetischen Potentials von SSAI-Trypsin. So konnte festgestellt werden, dass die Variante eine hohe Spezifität gegenüber Substratmimetika vom Typ 4-Guanidinophenylester aufweist. Hierbei wurde eine dem WT-Trypsin ähnliche S<sub>1</sub>'-Substratbindungsortspezifität gegenüber Methionin bestimmt. In anschließenden N-terminalen Modellmodifizierungsreaktionen konnten zwar nahezu quantitative Ausbeuten erreicht werden, jedoch kam es im Verlauf der Reaktion zu einer ausgeprägten Sekundärhydrolyse, was einen Einsatz von SSAI-Trypsin in der Semisynthese nur nach Optimierung der Reaktion erlauben würde.

---

<sup>13</sup> Gemeinsam mit Dr. Sandra Liebscher betreut.

### **Studien zur D-stereospezifische Hydrolase**

**2010** „Untersuchungen zu Substratspezifität der alkalinen D-Peptidase“ (Bachelorarbeit, Phillip Lössl)

Die Arbeit umfasst die Bestimmung der  $S_1$ -Substratbindungsortspezifität der D-stereospezifischen Hydrolase aus *Bacillus cereus* DSM-31T (BC\_DHy) und der D-stereospezifischen Hydrolase aus *Bacillus thuringiensis serovar* Berliner (DHy) mit Hilfe eine Aminosäuremethylesterbibliothek. Es konnte hierbei eine hydrolytische Aktivität gegenüber D-Aminosäure-enthaltenden Substraten bestätigt werden, wobei diese Präferenz in DHy deutlicher ausgeprägt ist als in BC\_DHy. Daneben konnte gezeigt werden, dass beide Proteasen eine deutliche Spezifität gegenüber Aminosäuren mit basischer Seitenkettenfunktion im  $S_1$ -Substratbindungstaschenbereich aufwiesen.

**2011** „Vergleichende Charakterisierung der Substratspezifität L- und D-stereospezifischer Proteasen“ (Diplomarbeit, Claudia Rößler)<sup>14</sup>

Die Arbeit fokussiert auf der Generierung einer Pentapeptidbibliothek zur zielgerichteten Charakterisierung der  $S_1'$ - bis  $S_3'$ -Substratbindungsortspezifität der alkalischen D-Peptidase, der D-stereospezifischen Hydrolase und von Clostripain. Die Substratbindungsortspezifitäten wurden folgend mittels Acyltransferreaktionen unter Verwendung benzoyleierter Aminosäuremethylester sowie dem Substratmimetikum Bz-Gly-OGp untersucht. Hierbei konnte erstmals eine Längenlimitierung der D-stereospezifischen Hydrolase, aber auch die Eignung der ADP zur Semisyntese von Peptiden und Proteinen gezeigt werden.

### **Weiterführende Arbeiten zu den D-stereospezifischen Hydrolasen**

**2013** „Charakterisierung neuartiger D-stereospezifischer Hydrolasen aus *Bacillus thuringiensis serovar* Berliner“ (Masterarbeit, Katharina Becker)<sup>15</sup>

Mithilfe der Proteinsequenzen von ADP und DHy konnten *in silico* weitere neuartige D-stereospezifische Hydrolasen in *Bacillus cereus serovar* Berliner identifiziert werden. Folgend wurden die Gene kloniert und heterolog in *E. coli* biosynthetisiert. Allen drei Proteasen, folgend als D-stereospezifische Hydrolase 2-4 (DHy2-4) bezeichnet, ist gemein, dass sie aufgrund ihrer vorhergesagten Struktur der Gruppe der Penicillin-bindenden Enzyme zugehörig sind. Daneben konnte in dieser Arbeit eine von der DHy abweichende  $S_1$ -Substratbindungsortspezifität gegenüber aromatischen D-Aminosäure-tragenden Substraten gezeigt werden

<sup>14</sup> Gemeinsam mit Dr. Sandra Liebscher betreut.

<sup>15</sup> Gemeinsam mit Dennis Treblow und Dr. Sandra Liebscher betreut.

**2015** „ Kinetische Charakterisierung D-stereospezifischer Hydrolase-Varianten“ (Masterarbeit, *Falko Jähnert*)<sup>16</sup>

Aufgrund der verschiedenen  $S_1$ -Substratbindungsortspezifitäten der dHy (basische D-Aminosäuren) und der dHy3 (aromatische D-Aminosäuren) fokussierte die Studie auf einer Übertragung dieser Spezifität von der dHy auf die dHy3. Hierfür wurden auf Grundlage der Kristallstruktur der dHy drei Proteinvarianten der dHy3 generiert, wobei trotz Steigerung der spezifischen Aktivität um das 10-fache gegenüber dem Substrat Bz-D-Arg/Lys-OMe nicht wirklich von einer Erhöhung der Substratbindungsortspezifität gesprochen werden kann, da der  $K_M$  nach wie vor im Vergleich etwa um das 1000-fache erhöht ist. Es konnte jedoch erstmals ein *Hotspot* zur Manipulation der  $S_1$ -Substratbindungsortspezifität bei D-stereospezifischen Hydrolasen identifiziert werden.

**2018** „Entwicklung und Etablierung einer Screeningplattform zu Bestimmung der Substratspezifität D-aminosäurespezifischer Proteasen“ (Masterarbeit, *Lennart Hartig*)<sup>17</sup>

Die Arbeit beschäftigte sich mit der Weiterentwicklung des ursprünglichen IQFS Abz-D-Arg-D-Ala-pNA hin zu einem System zur schnellen und effizienten Charakterisierung der  $S_1$ -Substratbindungsortspezifität von Proteasen. Dabei wurde 2-Aminobenzoessäure und N- $\epsilon$ -2,4-Dinitrophenyllysin als Fluorophor-Quencher-Paar gewählt, welche ein Hexapeptid mit variabler Aminosäure an  $P_3$ -Position N- bzw. C-terminal flankieren. Das System wurde folgend an sechs D-aminosäurespezifischen Proteasen (ADP, BC\_dHy, dHy, dHy2-4) validiert, womit die Arbeit erstmals die vollständigen proteolytischen  $S_1$ -Substratbindungsortspezifitäten dieser Enzymgruppe beschreibt.

**2019** „Darstellung und kinetische Charakterisierung modifizierter und neuartiger D-stereospezifischer Peptidasen“ (Masterarbeit, *Lara-Alina Pöttgen*)<sup>18</sup>

Im Fokus der Arbeit stand die Analyse der Peptidsubstratspezifitäten von D-Aminosäure-spezifischen Proteasen. Zum einen wurde als Fortsetzung der Masterarbeit von Falko Jähnert eine Analyse der Peptidhydrolyse der zur Generierung eine D-Arginin-Spezifität im  $S_1$ -Substratbindungsort rational erstellten dHy3-Varianten verfolgt. Zum anderen wurden mittels *in silico*-Studien zwei der Paenidase ähnliche Enzyme kloniert und charakterisiert, welche im  $S_1$ -Substratbindungsort eine D-Glutamat Spezifität aufweisen sollten. Es ist festzuhalten, dass beide Strategien zum Erfolg führten und daneben zahlreiche Optimierungsstrategien zur Bioverfügbarkeit D-Aminosäure-spezifischer Proteasen getätigt werden konnten.

---

<sup>16</sup> Gemeinsam mit Dennis Treblow und Dr. Sandra Liebscher betreut.

<sup>17</sup> Gemeinsam mit Falko Jähnert und Dr. Sandra Liebscher betreut.

<sup>18</sup> Gemeinsam mit Falko Jähnert betreut.



**2019** „Studien zur Hydrolyse von Gramicidin J1 durch dHy1“ (Bachelorarbeit, *Artem Govorukhin*)<sup>19</sup>

Im Fokus dieser Graduierungsarbeit stand die biologische Funktion der D-stereospezifischen Hydrolase. Hierfür wurden lineare Fragmente, die lineare Vollängensequenz sowie die zyklische Form von Gramicidin J1 dargestellt. Während gegenüber den linearen Konstrukten eine hohe spezifische hydrolytische Aktivität des Enzymes festgestellt werden konnte, wurde eine Hydrolyse des zyklischen Gramicidin J1 lediglich durch LC-MS nachgewiesen. Dieses Ergebnis legt die Rolle der D-stereospezifischen Hydrolase im Zuge eines Toxin-Antitoxin-Konzeptes nahe.

**2019** „Identifizierung mechanistische relevanter Residuen am Beispiel der D-stereospezifischen Hydrolase 4“ (Bachelorarbeit, *Konstantin Weigmann*)<sup>20</sup>

Gegenstand der Arbeit war eine Formulierung des Reaktionsmechanismus der D-stereospezifischen Hydrolase 4. Hierfür wurden Einzelaustauschvarianten in den katalytischen Motiven (SXXK, YXN, KTGX) generiert und folgend heterolog in *E. coli* biosynthetisiert. Bemerkenswerterweise gelang es hierbei nicht, die endoproteolytische Aktivität des Enzymes vollständig zu reduzieren. Daneben konnte gezeigt werden, dass sämtliche Austausche in oben genannten Motiven keinen bzw. nur einen marginalen Einfluss auf den  $K_M$ -Wert besitzen.

**2020** „Studien zur Charakterisierung der Substratbindungsbereiche D-stereospezifischer Peptidasen“ (Masterarbeit, *Jerome Genth*)<sup>21</sup>

Aufgrund des hohen synthetischen Potentials der dHy3 bzw. dHy4 beschäftigte sich die Arbeit mit der Generierung zweier Peptidbibliotheken, welche zur Charakterisierung der Spezifität des  $S_2$ - bzw.  $S_1'$ -Substratbindungsortes genutzt wurden. Als Kernergebnis dieser Arbeit kann festgehalten werden, dass beide Proteasen über eine L-D|L-Substratbindeortsselektivität verfügen und somit eine neuartige Subgruppe der DD-Peptidasen darstellen. Daneben konnte festgestellt werden, dass beide Proteasen in der Lage sind eine D-Phe-L-Pro-Bindung hydrolytisch zu spalten, was nach heutigem Stand einzigartig ist.

**2020** „Physikochemische Charakterisierung D-stereospezifischer Peptidasen“ (Bachelorarbeit, *Lukas Handke*)<sup>22</sup>

Im Zuge der Evaluierung des biotechnologischen Potentials wurde das pH-Profil sowie der Einfluss von Lösungsmitteln aller mittlerweile acht dHy-ähnlichen Enzyme (ADP, BC\_dHy, dHy, dHy 2-4, Paenidase A, Paenidase B) untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass nahezu alle Proteasen ein pH-Optimum im Bereich 8 - 10 besitzen und auch bei höherer Konzentration von DMF bzw. DMSO (bis zu 20 %) noch über eine endoproteolytische Aktivität verfügen.

---

<sup>19</sup> Gemeinsam mit Dr. Martin Dauner betreut.

<sup>20</sup> Gemeinsam mit Falko Jähnert betreut.

<sup>21</sup> Gemeinsam mit Falko Jähnert betreut.

<sup>22</sup> Gemeinsam mit Falko Jähnert betreut.

**2021** „Identifizierung mechanistisch relevanter Residuen am Beispiel der D-stereospezifischen Hydrolase 4“ (Bachelorarbeit, *Noelle Schwerdtner*)<sup>23</sup>

Die Arbeit baut unmittelbar auf der Bachelorarbeit von Konstantin Weigmann auf, wobei der Fokus auf der Identifizierung der allgemeinen Base bzw. der Ableitung eines Reaktionsmechanismus lag. Hierfür wurden insgesamt 13 Enzymvarianten der dHy4 dargestellt. Die Resultate bestätigen die Annahme, dass die dHy4 zumindest über einen Duade-Duade-Mechanismus verfügt, wobei auch ein Triade-Triade-Mechanismus denkbar wäre.

**vsI. 2021** „Physikochemische Charakterisierung D-stereospezifischer Peptidasen“ (Bachelorarbeit, *Paquita Giani*)<sup>24</sup>

Die Arbeit stellt eine auf der Bachelorarbeit von Lukas Handke aufbauende Studie dar. Hierbei wurde der Einfluss der Temperatur sowie von Metallionen von fünf dHy-ähnlichen Enzymen (ADP, dHy, dHy 2-4) untersucht. Mithilfe dieser beiden Studien ist es nun möglich, Aussagen über optimale Reaktionsbedingungen entsprechend dem potenziellen biotechnologischen Einsatz treffen zu können.

**vsI. 2021** „Enzymatische Hydrolyse von Gramacidin J1“ (Bachelorarbeit, *Leon Bonhardt*)<sup>25</sup>

In vorangegangenen Arbeiten konnte die chemische Synthese von Gramacidin J1, sowie die Hydrolyse dieses Antibiotikums durch dHy mittels LC-MS (Falko Jähnert) bestätigt werden. Aufbauend hierauf war es das Ziel, die enzymatische Hydrolyse von zyklischem Gramacidin J1 durch die dHy mittels ergänzender Verfahren zu verifizieren. Als Methode der Wahl wurde hierbei NMR (TOCSY, HSQC) verwendet. Durch Vergleichsmessungen (linear vor Zyklisierung, zyklisch, linear nach Hydrolyse) konnte so die hydrolytische Aktivität der dHy, sowie die Spaltposition in Gramacidin J1 nachgewiesen werden.

---

<sup>23</sup> Gemeinsam mit Falko Jähnert betreut.

<sup>24</sup> Gemeinsam mit Falko Jähnert betreut.

<sup>25</sup> Gemeinsam mit Dr. Sandra Liebscher und Dr. Christoph Wiedemann betreut.

## A8. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Familienname	Simon
Vorname	Andreas Hans
Vorhandener akademischer Grad	Diplom-Biochemiker
Geburtsdatum/-ort	13.12.1983 in Berlin
Geschlecht	männlich
Anschrift	Gerberastraße 1, 06122 Halle/Saale
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Ausbildung und beruflicher Werdegang

06/2021 – heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der BioPharma Translationsinstitut Dessau Forschungs GmbH
03/2020 – 05/2021	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Gründungsprojekt „TrypCo“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Förderung durch das Land Sachsen-Anhalt und durch die Europäische Union im Rahmen des ego.-Gründungstransfers
10/2016 – 02/2020	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der BioPharma Translationsinstitut Dessau Forschungs GmbH
08/2008 – 12/2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg (Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie, Abteilung Naturstoffbiochemie), Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Frank Bordusa zum Thema „ <b>Screening und Charakterisierung D-Aminosäure spezifischer hydrolytischer Enzyme</b> “
10/2003 – 07/2008	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit „ <b>Studien zur Unterdrückung der Autolyse von Trypsin</b> “ in der Abteilung Naturstoffbiochemie (Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie)
1995 – 2002	Allgemeine Hochschulreife, Rüleingnasium, Freiberg

## A9. Publikationsliste

### Publikationen

*Simon AH, Liebscher S, Aumüller TH, Treblow D & Bordusa F* "Application of a dual internally quenched fluorogenic substrate in screening for D-Arginine specific proteases." *Front Microbiol* 10: S. 711 (2019)

*Lubek D, Simon AH & Pinske C* "Amino acid variants of the HybB membrane subunit of *Escherichia coli* [NiFe]-hydrogenase-2 support a role in proton transfer" *FEBS Lett* 593(16), S. 2194 (2019)

### Patentanmeldung

WO/2020/127808: "Trypsin variants with improved enzymatic properties."

*Wartner R, Boehme M, Bordusa F, Simon AH & Richter T*, Internationales Anmeldedatum: 19. Dezember 2019; Veröffentlichungstag: 25. Juni 2020; Anmelder: BioPharma Translationsinstitut Dessau Forschungs GmbH

### Tagungsbeiträge – Vorträge

*Simon AH* "TrypCo® Technology - A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs" Bio International Convention 2019, 31.05.-06.06.2019, Philadelphia, PA, USA (2019)

### Tagungsbeiträge – Poster

*Simon AH, Böhme M, Wartner R, Meyer C, Dittrich F, Liebscher S & Bordusa F* „TrypCo® Technology - A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs" 9th Annual *World Antibody-Drug Conjugates (ADC)* San Diego 2018, 12.– 15.11.2018, San Diego, CA, USA (2018)

## A10. Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die vorliegende Arbeit wurde bislang an keiner anderen Hochschule oder Universität in dieser oder einer abgewandelten Fassung zur Dissertation eingereicht.

Halle, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Andreas H. Simon