

Etablierung des *Phage Display*-Verfahrens für die Optimierung der Trypsiligase

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Sabrina Gissel

geb. am 4. November 1983 in Bad Hersfeld

Gutachter:

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

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.04.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Kovalente Modifizierung von Proteinen.....	1
1.2 Methoden der Proteinmodifizierung	2
1.2.1 Chemische Methoden	2
1.2.2 Molekularbiologische Methoden	3
1.2.3 Enzymatische Methoden.....	4
1.2.3.1 Protease-katalysierte Peptidsynthese	7
1.2.3.1.1 Rationales Enzymdesign	10
1.2.3.1.2 Evolutives Enzymdesign	14
1.3 Leistungsmerkmale des <i>Phage Display</i> -Verfahrens.....	17
2 Zielstellung	21
3 Verwendete Materialien und Geräte.....	23
3.1 <i>Kits</i> , Chemikalien, Standards und Enzyme.....	23
3.2 Peptide und Substrate.....	23
3.3 Geräte.....	24
3.4 Materialien und Geräte für immunologische Nachweisverfahren	25
3.5 Materialien und Geräte für die Reinigung rekombinanter Proteine.....	26
3.6 Anzuchtmedien, Antibiotika und Puffer	26
3.6.1 Anzuchtmedien.....	26
3.6.2 Antibiotika.....	27
3.6.3 Puffer.....	27
3.7 Bakterien- und Hefestämme	28
3.8 Plasmide und Vektorkonstrukte.....	28
3.9 Oligodesoxyribonukleotide.....	30
4 Methoden	33
4.1 Klonierung benötigter Konstrukte für das <i>Phage Display</i>	33
4.1.1 Generierung von mpSCIL-Vektorkonstrukten.....	33
4.1.2 Generierung der Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene	33
4.2 Methoden zur Phagenamplifizierung, -titration und -anreicherung.....	36
4.2.1 Amplifizierung verwendeter Phagen	37

4.2.1.1	Amplifizierung von M13KO7-Helferphagen.....	37
4.2.1.2	Generierung einer Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf Proteinebene	37
4.2.1.3	Amplifizierung weiterer rekombinanter Phagen	38
4.2.2	Titration von Phagenlösungen	38
4.2.3	Selektive Anreicherung funktionaler rekombinanter Phagen	38
4.3	Vorversuche für das geplante <i>Phage Display</i> -Projekt	39
4.3.1	Streulichtexperimente	39
4.3.2	Eignung der verwendeten Peptide und Pufferbedingungen für die Selektion	40
4.3.3	Zugänglichkeit des immobilisierten Acyl donors	40
4.3.4	Funktionalität rekombinanter Phagen	40
4.4	Selektion von Trypsiligasevarianten	41
4.4.1	Selektionsverfahren mit Streptavidin- <i>coated</i> -96- <i>well</i> -Platten als Trägermaterial	41
4.4.2	Selektionsverfahren mit Streptavidin- <i>beads</i> als Trägermaterial.....	42
4.5	Immunologische Nachweisverfahren.....	42
4.5.1	<i>Western Blot</i> -Analysen	42
4.5.2	ELISA (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)	43
4.6	Molekularbiologische Arbeiten	43
4.6.1	Überexpressionstests	44
4.6.2	Erstellung von Wachstumskurven	44
4.6.3	Klonierung ausgewählter rekombinanter Proteine	44
4.7	Proteinchemische Methoden.....	45
4.7.1	Proteinanalytik.....	45
4.7.2	Expression und Reinigung ausgewählter rekombinanter Proteine	45
4.7.3	Charakterisierung ausgewählter Trypsiligasevarianten.....	47
4.7.3.1	Hydrolysestudien.....	48
4.7.3.2	Studien zur Bestimmung der Substratpräferenz.....	48
4.7.3.3	Transamidierungsstudien.....	48
4.7.3.4	Studien zur pH- und Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivität	48
4.7.3.5	CD-spektroskopische Untersuchungen	48
4.7.3.6	Modifizierung eines ausgewählten Fab-Fragmentes	49
5	Ergebnisse.....	50
5.1	Auswahl 5 geeigneter Randomisierungsstellen des Zielgens	50
5.2	Auswahl einer geeigneten Zelllinie	51
5.3	Generierung der Trypsiligasebibliothek auf DNA- und Proteinebene	52
5.4	Etablierung einer geeigneten Selektionsmethode	55

5.4.1	Untersuchung ausgewählter Selektionsbedingungen	55
5.4.2	Selektionsverfahren unter Verwendung von Streptavidin-coated-96-well-Platten.....	58
5.4.2.1	Stabilität der Phagemid-DNA	59
5.4.3	Etablierung eines Selektionsverfahrens in Lösung	61
5.4.3.1	Steigerung der Konzentration funktionaler rekombinanter Phagen.....	63
5.4.4	Finales Selektionsverfahren optimierter Trypsiligasevarianten	65
5.5	Identifizierte Trypsiligasevarianten 1–5	67
5.5.1	Klonierung, Expression und Reinigung der Trypsiligasevarianten	68
5.5.2	Charakterisierung der Trypsiligasevarianten 1–5.....	69
5.5.2.1	CD-spektroskopische Untersuchungen	69
5.5.2.2	Peptidhydrolyseverhalten und Substratpräferenzen	71
5.5.2.3	Transamidierungsverhalten.....	74
5.5.3	Weiterführende Charakterisierungen der Trypsiligasevariante 4	76
5.5.4	C-terminale Modifizierung eines Fab-Fragmentes.....	79
6	Diskussion.....	81
6.1	Auswahl geeigneter Randomisierungsstellen innerhalb der Trypsiligase	81
6.2	Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA- und Proteinebene	82
6.3	Selektionsmethode	86
6.4	Analyse der identifizierten Trypsiligasevarianten	95
6.5	Weiterführende Charakterisierung der Trypsiligasevariante 4 K60E/N143H/E151H/D189K/S61S/R62S/Q64H/S190G/Q192M.....	105
6.6	Besonderheiten der Trypsiligasevarianten hinsichtlich der Primärstruktur.....	111
7	Zusammenfassung.....	118
	Literaturverzeichnis.....	VII
	Danksagung	XIX
	Angaben zur Person	XX
	Selbstständigkeitserklärung	XXI

Abkürzungen

Zur Abkürzung der Aminosäuren sind die Drei- bzw. Einbuchstabenkodierungen nach IUPAC verwendet worden (Eur. J. Biochem. 1984, 138, 9-37)

Abz	2-Aminobenzoessäure
Ac	Acetat
ADC	<i>Antibody Drug Conjugate</i>
AMC	Aminomethylcoumarin
AP	Alkaline Phosphatase
AS	Aminosäure
AU	Absorptionseinheiten
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bio	Biotinyl
Bis-Tris-Propan	(1,3-Bis[Tris(Hydroxymethyl)methylamino]-Propan)
bp	Basenpaar
BPTI	<i>Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor</i>
Bz	Benzoyl
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	Circulardichroismus
CF	Carboxyfluorescein
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
Da	Dalton
Dap	2,3-Diaminopropionsäure
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbend Assay</i>
ESI	<i>Electro Spray Ionization</i>

Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
for	<i>forward</i>
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
Gp	Guanidinophenyl
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatographie</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HT	<i>High Tension Voltage</i>
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -galactopyranosid
ITCHY	<i>Iterative Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes</i>
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
Na	Natrium
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NNK	N: ATGC; K: GT
OD	Optische Dichte
ORI	<i>Origin of Replication</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline containing Tween[®]20</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RACHITT	<i>Random Chimeragenesis on Transient Templates</i>
RID	<i>Random Insertion/Deletion Mutagenesis</i>
Rekomb.	Rekombinante
rev	<i>reverse</i>

rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i>
SPI	<i>Selective Pressure Incorporation</i>
StEP	<i>Staggered Extension Process</i>
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TAG	Amber-Stop-Codon
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline containing Tween®20</i>
tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatographie
UV	Ultraviolett
v	Volumen
vA	initiale Aminolysegeschwindigkeit
vH	initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit
vH'	initiale Primärhydrolysegeschwindigkeit
VIS	<i>visible</i> (visueller Bereich des Lichtspektrums)
w	Gewicht
<i>wt</i>	Wildtyp
Xaa	beliebige Aminosäure
Xp	maximale Ausbeute
Z	Benzyloxycarbonyl
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Kovalente Modifizierung von Proteinen

Natürlich vorkommende kovalente Proteinmodifizierungen *in vivo* bieten die Möglichkeit, die Funktionalität proteinogener Aminosäureseitenketten zu erhöhen. Eine Variabilität der Enzymaktivität, Proteininstabilität und Lokalisation der Zielproteine sowie die Einführung neuartiger Bindestellen für Interaktionspartner wird somit innerhalb von Zellsystemen realisiert [1]. Zur selektiven Einführung solcher Modifizierungen kann sich die Natur einer Vielzahl von Enzymen bedienen. Prominente Vertreter posttranslationaler Modifizierungen sind Glykosylierungen, Ubiquitinylierungen, Lipidierungen, Biotinylierungen sowie Phosphorylierungen [2]. Die medizinische und biochemische Relevanz artifizieller Modifizierungen wird insbesondere bei Betrachtung therapeutischer Proteine deutlich. Durch die Verwendung PEG¹-modifizierter Proteine als Pharmazeutika konnte beispielsweise die Halbwertszeit und die damit einhergehende Bioverfügbarkeit gesteigert werden [3]. Begründet liegt dies unter anderem in einer Erhöhung des Molekulargewichts des Therapeutikums und einer daraus resultierenden geringeren glomerulären Filtrationsrate [4]. Ein weiteres Kriterium für die Anwendbarkeit therapeutischer Proteine ist die Antigenität, die durch die Verwendung PEG-derivatisierter Proteine herabgesetzt werden kann [5]. Therapeutische Proteine dieser Klasse sind unter anderem die PEG-modifizierte Adenosin-Deaminase (ADAGEN[®]), L-Asparaginase (ONCASPAR[®]) und das PEG-modifizierte Interferon α -2a (PEGAYSYS[®]), welche bereits in der klinischen Therapie etabliert sind. PEG-modifizierte Adenosin-Deaminase wird zur Therapie angeborener Immundefekte eingesetzt [6], das PEG-modifizierte Interferon α -2a zur Behandlung von chronischen Hepatitis C und B Erkrankungen [7] und die PEG-modifizierte L-Asparaginase zur Behandlung akuter lymphoblastischer Leukämie [8]. Durch Einführung der Modifizierung konnten allergische Reaktionen, hervorgerufen durch die konventionelle L-Asparaginase, deutlich herabgesetzt werden [9]. Ein weiterer Vorteil der PEG-derivatisierten Form ist die erhöhte Halbwertszeit. Patienten müssen mit diesem neuartigen Wirkstoff nur noch alle zwei Wochen behandelt werden, wohingegen bei der unmodifizierten L-Asparaginase eine Behandlung zwei- bis dreimal die Woche notwendig ist [10]. Proteinmodifizierungen spielen auch auf dem Gebiet monoklonaler Antikörper und deren Derivaten eine bedeutende Rolle, die zu der am schnellsten wachsenden Gruppe therapeutischer Proteine der heutigen Zeit gehören [11]. Bei Certolizumab Pegol (Handelsname CIMZIA[®]; UCB Pharma, Brüssel [12]) handelt es sich um ein rekombinantes,

¹ Sämtliche Abkürzungen werden im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

humanisiertes und PEG-derivatisiertes Fab-Fragment [13], welches als TNF-Blocker wirkt und zur Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn [14, 15] oder rheumatoider Arthritis [16–18] eingesetzt wird. Kombiniert man die einzigartige Spezifität von monoklonalen Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten weiterführend mit zytotoxischen Molekülen oder Radionukliden erhält man wirkungsvolle Therapeutika (*Antibody Drug Conjugates* – ADCs), welche speziell in der Onkologie breite Anwendung finden [19–22]. Aktuell sind laut der *U.S. National Institutes of Health* über 50 klinische Studien für ADCs gelistet (eigene Recherche), was die Relevanz dieser Konjugate als Therapeutika unterstreicht. Zur Einführung von Modifizierungen in Proteine stehen chemische, molekularbiologische und enzymatische Methoden generell zur Verfügung, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2 Methoden der Proteinmodifizierung

1.2.1 Chemische Methoden

Mit Einführung der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield [23] gelang ein Meilenstein auf dem Gebiet der Peptidsynthese. Unter Verwendung dieser Methode können bereits während der Synthese Modifizierungen kovalent in Polypeptide eingeführt werden. Nachteilig ist hier eine fehlende Regio- und Stereospezifität, die eine aufwendige Schutzgruppenstrategie erfordert. Ein weiterer Nachteil ist die Limitation dieser Methode auf eine Kettenlänge von ca. 50 Aminosäuren [24], begründet auf der Entstehung von Rumpf- oder Fehlsequenzen bei unvollständigen Umsätzen sowie auf der Ausbildung sekundärer Strukturelemente innerhalb der Polypeptidkette. Eine Umgehung dieser Längenlimitation ist durch die Etablierung chemoselektiver Ligationsverfahren wie der Staudinger-Ligation [25–27] und der *Native Chemical Ligation* [28] gelungen. Hierbei wird ein Peptid mit C-terminalem Thioester bzw. Phosphinothioester mit einem weiteren Peptid zur Reaktion gebracht, welches N-terminal über ein freies Cystein bzw. Peptidazid verfügt [26, 29]. Nachteilig auf diese Art der chemischen Synthese von Proteinen wirkt sich eine anschließende Rückfaltung der Reaktionsprodukte zum Erhalt aktiver Proteine aus. Die Modifizierung aktiver Proteine nach deren Expression bietet ebenfalls vielfältige Möglichkeiten der Einführung neuer Funktionalitäten. Zu nennen ist hier beispielsweise die Modifizierung von Thiolgruppen der Cysteinseitenketten mit kommerziell verfügbaren Maleimiden [30] und die Modifizierung freier Aminogruppen durch ebenfalls kommerziell erhältliche *N*-Hydroxysuccinimidyl-Ester [31]. Auch für die bereits erwähnte Derivatisierung von Proteinen mit Polyethylenglykol kommen kommerziell verfügbare amin- oder thiolreaktive Reagenzien zum Einsatz [32, 33]. Limitierend wirkt sich hier allerdings die Bildung heterogener Produktgemische aus, da die verwendeten Reagenzien zwar chemoselek-

tiv, jedoch nicht regiospezifisch sind und in der Regel mehrere reaktive Funktionalitäten im Protein zur Verfügung stehen. Bei dem Vorhandensein mehrerer Cysteinseitenketten im Protein bedarf es daher beispielsweise einer aufwendigen Schutzgruppenstrategie zur Umgehung der fehlenden Regiospezifität [34]. Auch bei der Herstellung von ADCs, bei der die Modifizierung ebenfalls überwiegend über thiol- bzw. aminreaktive Reagenzien erfolgt [35], kommt es somit zur Bildung von heterogenen Produktgemischen [36]. Bei der Modifizierung des humanisierten huN901 Antikörpers mit einem Maytansin-Derivat kommt es beispielsweise zur Einführung von 1–6 zytotoxischen Targets pro Antikörper [37]. Nachteilig wirkt sich die Bildung heterogener Produktgemische aus, da der therapeutische Index der ADCs von der Anzahl der zytotoxischen Targets pro Antikörper abhängig ist [38]. Zusätzlich bedarf es bei der chemischen Modifizierung von Proteinen mitunter Reaktionsbedingungen (z. B. Zusatz organischer Lösungsmittel, unphysiologische pH-Werte, etc.), die einen Aktivitätsverlust der Zielproteine nicht ausschließen. Alternativen bieten hier molekularbiologische bzw. enzymatische Methoden der Proteinmodifizierung.

1.2.2 Molekularbiologische Methoden

Weit verbreitete Beispiele zur Einführung von Proteinmodifizierungen bieten ausgewählte molekularbiologische Methoden. Zu nennen ist hier die Einführung von Affinitätsfusionen zur Proteinreinigung [39,40] und die Modifizierung von Zielproteinen mit fluoreszierenden Proteinen. Prominentester Vertreter ist das grünfluoreszierende Protein (GFP), welches für Lokalisationsexperimente *in vivo* Anwendung findet [41,42]. Eine veränderte Lokalisation, Funktion und Eigenschaft des Zielproteins durch die GFP-Fusion ist jedoch nicht auszuschließen, was eine universelle Anwendbarkeit einschränkt [43]. Auch die zur PEG-Derivatisierung alternative PAS²-Fusion kann auf molekularbiologischem Weg in Zielproteine eingefügt werden. Analog zur PEG-Derivatisierung wird die Tripeptidsequenz PAS bis zu 200-mal an einen Terminus des Proteins fusioniert, was ebenfalls eine reduzierte renale Ausscheidung zur Folge hat [44]. Dieser Ansatz konnte erfolgreich für ein humanisiertes anti-HER2 Fab-Fragment, ein humanes Interferon α -2b und ein humanes Wachstumshormon gezeigt werden. Nachteile einer PEG-Derivatisierung, wie beispielsweise der eingeschränkte Abbau des Polyethylenglykols und eine dadurch bedingte Akkumulation in den Nierenkanälen, können hier umgangen werden [44]. Weiterhin können Antikörperfragmente gezielt an deren C-Termini durch Verwendung des SNAP-tags (Derivat der humanen O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase AGT) modifiziert werden [45]. Diese 182 Aminosäuren umfassende

² Polypeptidketten bestehend aus den Aminosäuren Prolin, Alanin, Serin

Fusion wird zunächst molekularbiologisch in Proteine eingeführt, um eine *in vivo*- oder *in vitro*-Umsetzung dieser Fusion mit O^6 -Benzylguanin enthaltenden Modifizierungsreagenzien zu ermöglichen [46–48], wobei das O^6 -Benzylguanin das natürliche Substrat dieses Enzyms/SNAP-tags darstellt. Die beachtliche Größe der Fusion sowie die Notwendigkeit der Derivatisierung des O^6 -Benzylguanins mit den gewünschten Modifizierungsreagenzien schränken diese Methode jedoch stark ein.

Die molekularbiologischen Methoden beschränkten sich lange Zeit auf den Einbau proteinogener Aminosäuren, was sich limitierend auf die Diversität der möglichen Modifizierungen auswirkt. Eine Möglichkeit unnatürliche Aminosäurederivate *in vivo* in Proteine einzufügen, bietet die Methode der *Selective Pressure Incorporation* (SPI) [49]. Das einer natürlichen Aminosäure analoge Aminosäurederivat wird hierbei einem Minimalmedium extern zugegeben, wodurch es in der Folge in entsprechende Aminosäure-auxotrophe *E. coli*-Stämme inkorporiert wird. Ein gezielter Einbau des entsprechenden Aminosäurederivates während der Proteinbiosynthese ist jedoch nicht möglich, da es zu einem Einbau des Derivates an allen der komplementären Aminosäure entsprechenden Stellen im Protein kommt [49]. Zudem ist eine Vielzahl der Aminosäureanaloge toxisch für die verwendeten *E. coli*-Zellen, was sich ebenfalls nachteilig auf diese Methode der Proteinmodifizierung auswirkt [49]. Ein gezielter Einbau nicht-proteinogener Aminosäuren *in vitro* kann durch die Erweiterung des genetischen Codes realisiert werden, wobei chemisch aminoacylierte, gegen das *Nonsense*-Codon TAG gerichtete Supressor-tRNAs zum Einsatz kommen [50]. Durch die Verwendung dieser Methode konnte eine gezielte Fusionierung des anti-HER2 Fab-Fragmentes mit einem Auristatin-Derivat gezeigt werden. Zunächst wurde an einer ausgewählten Position ein *p*-Acetylphenylalanin als chemischer Anker in das Fab-Fragment eingeführt, welches anschließend zur Generierung des *Antibody Drug Conjugates* mit einem Alkoxy-Amin-Auristatin umgesetzt wurde [51]. Die Suche nach geeigneten, für die unnatürlichen Aminosäurederivate spezifischen tRNA/tRNA-Synthetase-Paaren schränkt die universelle Anwendbarkeit dieser Methode in der Praxis jedoch ein.

1.2.3 Enzymatische Methoden

Enzymatische Methoden bieten die Möglichkeit, Proteinmodifizierungen regio- und stereospezifisch unter milden Reaktionsbedingungen in Proteine einzuführen. In der Praxis bedient man sich häufig Enzymen, die auch *in vivo* Modifizierungsreaktionen katalysieren. Entsprechende Erkennungssequenzen können mittels ortsgerichteter Mutagenese in die Zielstruktur eingeführt und anschließend regio- und stereospezifisch modifiziert werden. Prominente Ver-

treter solcher natürlich vorkommender Enzyme, welche zur Modifizierung von Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten Anwendung finden, werden im Folgenden vorgestellt. Die Biotin-Ligase aus *E. coli* (BirA) katalysiert die Übertragung von Biotin auf eine Erkennungssequenz bestehend aus 13 Aminosäuren und kann somit für die Biotinylierung von Proteinen eingesetzt werden [52]. Die C-terminale Fusionierung eines Fab-Fragmentes mit einer solchen Erkennungssequenz ermöglichte eine erfolgreiche Biotin-Derivatisierung mit einer Ausbeute von 40 % [31]. Ein weiteres bekanntes Enzym zur Modifizierung von Proteinen ist die Transglutaminase. Dieses Enzym katalysiert zum einen den Acyltransfer zwischen der γ -Carboxyamidgruppe von proteingebundenen Glutaminseitenketten und Amino-Gruppen [53, 54] und zum anderen zwischen Glutamin- und Lysinseitenketten [55]. Beispielsweise konnte eine Transglutaminase-katalysierte Modifizierung von IgG1 mit fluorophoren Gruppen gezeigt werden, wobei man sich einzelner proteingebundener Glutamin- bzw. Lysinseitenketten bediente. Umgesetzt wurden diese mit Substraten, die terminale Lysinderivate bzw. Glutaminseitenketten als Aminokomponente aufwiesen [56]. Ebenfalls konnte eine Derivatisierung eines monoklonalen IgGs mit Biotin gezeigt werden [57]. Auf lange Erkennungssequenzen, wie sie bei der Verwendung der Biotin-Ligase von Nöten sind, konnte hierbei verzichtet werden. Eine Modifizierung aller verfügbaren Aminofunktionalitäten, wie im Falle der Verwendung von *N*-Hydroxysuccinimidyl-Estern, kann mit dieser Methode ebenfalls umgangen werden. Auch eine Beladung von *Antibody Drug Conjugates* an ausgewählten Modifizierungsstellen der leichten und schweren Kette mit zytotoxischen Substanzen konnte gezeigt werden [58]. Im Rahmen einer Transglutaminase-katalysierten Generierung von ADCs konnten selektive und stöchiometrische Modifizierungen von IgG1 mit unterschiedlichen zytotoxischen Modifizierungsreagenzien gezeigt werden [59]. Die Notwendigkeit der Lokalisation der zu modifizierenden Glutaminseitenkette in einer hoch flexiblen Region des Proteins sowie spezifische, die Modifizierungsstelle flankierende Aminosäureseitenketten schränken die Anwendung dieses Biokatalysators jedoch ebenso ein wie eine zum Teil notwendige Deglykosylierung des Zielproteins zur Verbesserung der Zugänglichkeit der Modifizierungsstelle [5, 59]. Bei der Sortase A aus *Staphylococcus aureus* handelt es sich um einen prominenten Vertreter für Proteinmodifizierungen der heutigen Zeit. Die Sortase A ist eine Cystein-Transpeptidase aus der Zellwand gram-positiver Bakterien, welche für die Verankerung von Oberflächenproteinen in der Zellwand verantwortlich ist. Dieser Biokatalysator erkennt das LPXTG-Motiv [60] eines Oberflächenproteins, wobei X eine beliebige Aminosäureseitenkette ist und Glycin keine freie Carbonsäure darstellt [61, 62]. Die Spaltung der Erkennungssequenz C-terminal der Threoninseitenkette führt zu der Ausbildung des Acyl-Enzym-

Intermediates, welches durch eine *N*-terminale Pentaglycinsequenz des Lipids II in der Zellwand gram-positiver Bakterien nukleophil angegriffen und deacyliert wird [63, 64]. Das aktive Zentrum der Sortase A weist überwiegend hydrophobe Bereiche auf, die eine effiziente Transpeptidierung ermöglichen. Aufgrund der hohen Hydrophobizität des aktiven Zentrums werden Wassermoleküle aus diesem verdrängt und stehen für die Hydrolyse der LPXTG-Erkennungssequenz nicht mehr zur Verfügung [65]. Der natürliche Reaktionsmechanismus einer Peptidbindungsbildung dieses Enzyms ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

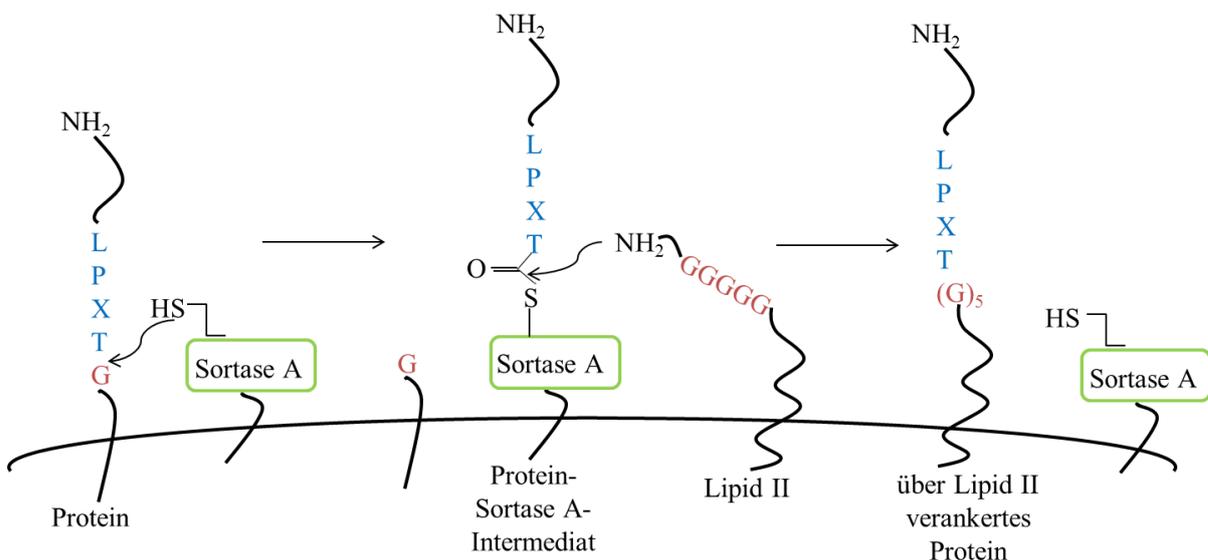


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer Sortase A-katalysierten Reaktion *in vivo* [61].

Es konnten Sortase-vermittelte Modifizierungen an verschiedenen Zielstrukturen gezeigt werden, was die generelle Anwendbarkeit dieses Biokatalysators bestätigt. Realisiert werden konnten sowohl *N*- und *C*-terminale Modifizierungen als auch die Generierung chimerer Proteine durch eine Sortase-vermittelte Einführung chemischer Anker [61, 64, 66]. Eine *C*-terminale Modifizierung eines monoklonalen Antikörpers gegen Lectin (α DEC205) durch eine GFP-Fusion (Ausbeute ~90 %) [67] und die Fusionierung eines L19-IgG-Fab-Fragmentes, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne von Fibronectin, mit dem Fluorophor DY-647 (Ausbeute ~85 %) [68] konnte ebenfalls erfolgreich gezeigt werden. Nachteilig bei der Verwendung der Sortase A zur Proteinmodifizierung wirkt sich die Reversibilität der Reaktion aus, welche erst durch die aufwendige Synthese von Depsipeptiden umgangen werden konnte [69]. Ebenfalls hinderlich auf eine universelle Anwendbarkeit Sortase A-katalysierter Proteinmodifizierungsreaktionen wirkt sich der hohe Enzymbedarf aus, welcher für die Kompensation langer Reaktionszeiten unabdingbar ist [70–72]. Es wird daher überwiegend mit Enzymkonzentrationen im Bereich von 0,1 bis 10 Äquivalenten verglichen mit dem Zielprotein gearbeitet [61, 66, 69, 73]. Trotz der recht hohen Enzymkonzentrationen finden Modifi-

zierungsreaktionen eher in einer Zeitspanne von mehreren Stunden als von Minuten statt [60, 61, 66, 69]. Hohe Anforderungen werden zudem an die Erkennungssequenz LPXTG als solche gestellt, die sich in einem flexiblen und unstrukturierten Bereich des Zielproteins befinden muss [73]. Die Aminosäureseitenketten in P2^c-, P4^c- und P5^c-Position C-terminal des Glycinrestes der LPXTG-Erkennungssequenz (LPXTGXaa_{p2}^c·Xaa_{p3}^c·Xaa_{p4}^c·Xaa_{p5}^c) haben zusätzlich entscheidenden Einfluss auf die Lage des Gleichgewichts sowie auf die benötigte Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts der Transpeptidierungsreaktion [60]. Für eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit ist die Wahl des Nukleophils ebenfalls nicht zu vernachlässigen. Ein Nukleophil bestehend aus 4 Glycinresten weist eine Michaeliskonstante von 16 μM auf. Ein Nukleophil bestehend aus 2 Glycinresten hingegen einen um den Faktor 1,9 gesteigerten Wert von 30 μM [71]. Somit bedarf es in der Anwendung der Sortase A für Proteinmodifizierungen detaillierter Kenntnis über die Eignung der LPXTG-Erkennungssequenz in Kombination mit der Eignung des Nukleophils, um die Reaktionszeiten nicht zusätzlich herabzusetzen bzw. Ausbeuteverluste zu minimieren. Ebenfalls limitierend auf die universelle Anwendbarkeit der Sortase A wirkt sich die Akzeptanz unprotonierter ϵ -Aminogruppen von Lysinseitenketten als Substrate aus, was die Bildung unerwünschter Nebenprodukte im Zuge der Modifizierungsreaktionen bedingt [68]. Bei Betrachtung von ADCs wird ein weiterer Nachteil Sortase A-katalysierter Proteinmodifizierungen erkennbar. Die Ausscheidung von *Antibody Drug Conjugates* aus dem Plasma (*plasma clearance*) steigt mit steigender Hydrophobizität des Konjugates, was die Wirksamkeit von ADCs *in vivo* herabsetzt [74]. Im Rahmen einer Sortase A-katalysierten Verbindung eines Wirkstoffs mit einem monoklonalen Antikörper könnte das hydrophobe aktive Zentrum des Enzyms eine Erhöhung der Hydrophilie von ADCs erschweren. Hydrophilere Strukturen können möglicherweise nicht mehr effizient genug in das aktive Zentrum der Sortase A einbinden, was die Umsatzrate solcher Strukturen herabsetzen und zu Ausbeuteverlusten führen könnte.

1.2.3.1 Protease-katalysierte Peptidsynthese

Aufgrund der mikroskopischen Reversibilität enzymatischer Reaktionen und die dadurch bedingte reverse Proteolyse finden sich weitere mögliche Biokatalysatoren zur spezifischen kovalenten Proteinmodifizierung in der Klasse der Proteasen.

Eine der ersten Protease-katalysierten Synthesen einer Peptidbindung wurde 1938 durch den Einsatz der Cysteinprotease Papain beschrieben [75]. Weitere prominente Vertreter von *wt*-Proteasen, welche zur Peptidligation eingesetzt wurden, sind Thermolysin [76], V8-Protease [77, 78] und Clostripain [79, 80]. Ein Beispiel einer *wt*-Protease, welche zur

kovalenten Modifizierung von Proteinen eingesetzt werden konnte, ist die IgA-Protease. Durch dieses Enzym konnte eine *N*-terminale Modifizierung eines Anticalins mit einem Tetrapeptid gezeigt werden, wobei die Ausbeute bei 30 % lag [81]. Durch die genannten Beispiele wird deutlich, dass sich Proteasen in der Peptidligation etabliert haben und die Proteinmodifizierung ein weiteres Anwendungsgebiet darstellt. Das Gleichgewicht der reversen Proteolyse *in vivo* liegt mit einer Gleichgewichtskonstanten von $< 10^{-5}$ [82] jedoch weit auf Seiten der Proteolyse und damit einhergehend auf Seiten der Hydrolyseprodukte. Es bedarf demnach der Manipulation der Reaktionsbedingungen, um die reverse Proteolyse für Peptidbindungsbildungen anwendbar zu machen und das Gleichgewicht auf Seiten der Ligationsprodukte zu verschieben. Alternativ zur gleichgewichtskontrollierten Peptidsynthese hat sich vor allem die kinetisch kontrollierte Reaktionsführung etabliert.

Bei dem gleichgewichtskontrollierten Modell handelt es sich um eine direkte Umkehr der Protease-katalysierten Hydrolyse einer Peptidbindung. Anwendung findet dieses Modell bei allen Proteasen, unabhängig ihres individuellen Katalysemechanismus, unter Verwendung von Acylkomponenten mit freiem *C*-Terminus. Der Entzug der Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht des endergonen Prozesses ist hierbei eine Möglichkeit, die Produktausbeute zu steigern. Nachteile ergeben sich dennoch aus der oftmals nur geringen Produktausbeute, dem hohen Enzymbedarf sowie der langsamen Synthesegeschwindigkeit. Ein weiterer Nachteil besteht in der Notwendigkeit des Einsatzes organischer Lösungsmittel, um einen, für die Synthesereaktion essentiellen, ungeladenen Zustand der Reaktanden zu ermöglichen [82, 83].

Voraussetzung für eine kinetisch kontrollierte, Protease-katalysierte Peptidsynthese ist die Verwendung von Cystein- oder Serinproteasen. Serinproteasen, der etwa 1/3 aller Proteasen angehören, ist eine konservierte Serinseitenkette im aktiven Zentrum gemeinsam, die dieser Enzymgruppe ihren Namen gab [84]. Eine konservierte katalytische Triade aus den Aminosäureseitenketten Ser, Asp und His weisen vier strukturell unterschiedliche Clans der Serinproteasen auf – Chymotrypsin, Subtilisin, CLP-Proteasen und CarboxypeptidaseY [84] (MEROPS-Nomenklatur [85]). Prominente Vertreter des Clans Chymotrypsin-ähnlicher Proteasen sind Trypsin und Chymotrypsin, die im aktiven Zentrum die konservierte katalytische Triade aus den Aminosäureseitenketten Ser195, Asp102 und His57 aufweisen [84]. Im Zuge des Katalysemechanismus Chymotrypsin-ähnlicher Serinproteasen, welcher eine Kombination aus kovalenter- und Säure-Base-Katalyse darstellt, kommt es nach Einbindung des Substratmoleküls und Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes sowie dessen Auflösung zur Ausbildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates. Dieses wird durch den nukleophilen

Angriff der β -Hydroxygruppe des Ser195 an den Carbonyl-Kohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung ausgebildet [84]. Die Deacylierung dieses Komplexes erfolgt ebenfalls durch einen nukleophilen Angriff, wobei verschiedene Nukleophile als Reaktionspartner fungieren können. Als Nukleophile eignen sich Amine, Thiole, Alkohole und Wasser [83, 84, 86]. Handelt es sich bei dem Nukleophil um eine Aminosäure oder um ein Peptidderivat, wird eine neue Peptidbindung im Rahmen der nukleophilen Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates gebildet, wobei es bei der kinetisch kontrollierten Reaktionsführung zu einer temporären Produktakkumulation kommt [82]. Durch die Verwendung aktivierter Ester als Carboxykomponente, die eine schnelle Acylierung und damit eine schnelle Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates ermöglichen, können Produktkonzentrationen erzielt werden, die weit über den thermodynamisch determinierten liegen [87]. Die Verwendung spezifischerer Substrate als die daraus gebildeten Produkte bedingt ein Maximum an Produktausbeute, welches durch eine langsamere Produkthydrolyse im Zuge der Reaktion wieder abnimmt. Gekennzeichnet ist diese Reaktionsführung durch schnelle Synthesezeiten und geringe Enzymkonzentrationen [82]. Selbst unter der kinetischen Kontrolle sind Proteasen jedoch keine optimalen Acyltransferasen, da es zu der konkurrierenden Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates durch Wasser und der damit einhergehenden unerwünschten Bildung des korrespondierenden Hydrolyseproduktes kommt. Zusätzlich schränkt die Primärspezifität der Protease die Wahl der Substrate stark ein und es kann eine proteolytische Spaltung sowohl der Edukte als auch der Substrate erfolgen [83]. Zur Umgehung dieser Limitationen stehen vielfältige Strategien zur Optimierung der kinetisch kontrollierten Peptidsynthese zur Verfügung. Etabliert haben sich neben der Optimierung des Mediums eine Optimierung der Substrate sowie eine Optimierung des Biokatalysators selbst. Ziel des *Medium Engineering* ist die Minimierung der Wasserkonzentration im Reaktionsmedium, um unerwünschte Hydrolysereaktionen in den Hintergrund zu drängen. Hierfür kommen insbesondere organische Lösungsmittel, ionische Flüssigkeiten oder gefrorene-wässrige Systeme zum Einsatz [83]. Die Verlagerung des Spezifitätszentrums in die Esterabgangsgruppe ist Schwerpunkt des *Substrate Engineering* [83]. Realisiert werden kann dies in den Substratmimetika, unter deren Verwendung irreversible Peptidligationen unabhängig von der Präsenz einer, für die Protease spezifischen Aminosäure durchgeführt werden können [88, 89]. Die Einbindung eines Substratmimetikums im Vergleich zu einem herkömmlichen Acyldonor in den Substratbindebereich ist beispielhaft für *wt*-Trypsin in Abbildung 1.2 A) dargestellt.

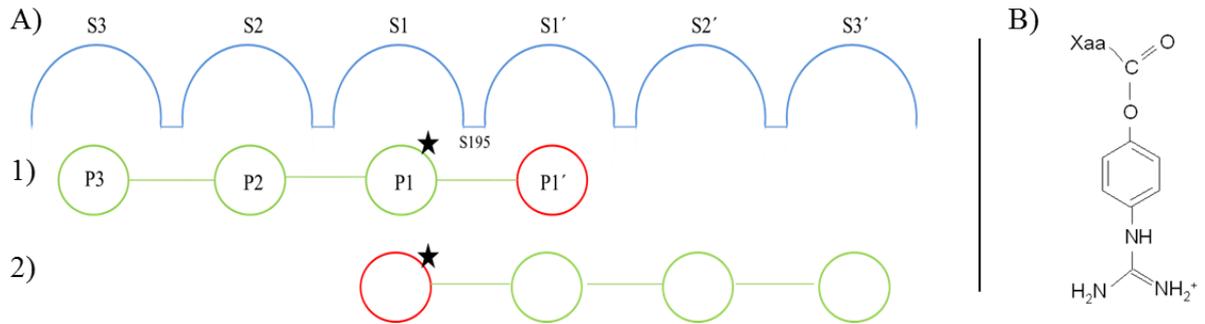


Abbildung 1.2: **A)** Vergleich der Einbindung eines herkömmlichen Acyldonors 1) mit der eines Substratmimetikums 2) in den Substratbindebereich von *wt*-Trypsin. Die Abgangsgruppen sind Rot hervorgehoben, die Acylreste sind Grün hervorgehoben. Der Stern markiert das jeweilige Spezifitätszentrum. **B)** Struktur des 4-Guanidinophenylesters, der ein Substratmimetikum für Trypsin und Chymotrypsin darstellt.

Bei der Verwendung eines Substratmimetikums wird nach Spaltung der Abgangsgruppe und Ausbildung des Acyl-Enzym-Intermediates eine Umlagerung des Acylrestes in den S-Bindungsort postuliert, die nachfolgend eine Deacylierung durch Wasser oder eine Aminosäure ermöglicht [90, 91].

Ein Substratmimetikum sowohl für Trypsin als auch für Chymotrypsin ist der 4-Guanidinophenylester, welcher in Abbildung 1.2 B) dargestellt ist. Die Guanidinofunktion des 4-Guanidinophenylesters stellt ein Substrat für Trypsin dar, die Phenylfunktion entsprechend für Chymotrypsin, was eine Erkennung des OGp-Esters gleichermaßen von Trypsin und Chymotrypsin unabhängig der Aminosäuresequenz ermöglicht [86]. Da Proteasen in ihrer nativen Form keine optimalen Acyltransferasen darstellen und es trotz des Substratmimetika-Konzeptes bei Präsenz spezifischer Aminosäureseitenketten für die Protease zur unerwünschten Spaltung sowohl der Substrate als auch der Ligationsprodukte kommt, bedarf es der zusätzlichen Optimierung der verwendeten Biokatalysatoren. Zur Optimierung der Biokatalysatoren im Rahmen eines *Enzyme Engineerings* stehen sowohl rationale als auch evolutive Ansätze zur Verfügung.

1.2.3.1.1 Rationales Enzymdesign

Bedingung für ein rationales Enzymdesign ist zum einen die Verfügbarkeit von Strukturdaten des zu optimierenden Biokatalysators und zum anderen ein detailliertes Wissen über das Zusammenspiel aus Struktur und Funktion bzw. Struktur und Katalysemechanismus [92]. Da diese jedoch nicht immer zur Verfügung stehen, ist eine universelle Anwendung dieser Methode oft eingeschränkt [93]. Sind die erforderlichen Strukturdaten vorhanden, werden potentiell geeignete Mutationsstellen des Zielproteins häufig durch Sequenzvergleiche mit homologen Strukturen oder Modellstrukturen ausgewählt [92]. Nach Expression und Reinigung neuartiger Biokatalysatoren müssen diese bezüglich der gewünschten Eigenschaften bzw. der

erfolgten Optimierungen sukzessive charakterisiert werden. Trotz der angesprochenen Einschränkungen dieser Methode ist es gelungen, vielfältige Biokatalysatoren auf diesem Wege zu optimieren.

Eindrucksvolle Beispiele einer erfolgreichen Optimierung sind die Enzyme Subtiligase und Trypsiligase.

Durch Einführen der Mutationen S221C/P225A in die Serinprotease Subtilisin-BPN' gelang es, eine proteolytisch inaktive Peptidligase zu generieren, die in der Lage ist, Peptidbindungen in wässrigen Lösungen zu knüpfen [94]. Dieses Enzym wird aufgrund seiner Funktion als Subtiligase bezeichnet [95]. Subtiligase-katalysiert gelang es, die aus 142 Aminosäuren bestehende aktive Ribonuklease A mit einer Ausbeute von 8 % aus veresterten Peptidfragmenten zu synthetisieren. Eine für die katalytische Aktivität notwendige Rückfaltung der synthetisierten Enzyme wirkt sich jedoch limitierend auf die Methode der Subtiligase-katalysierten Peptidbindungsbildung aus. Weitere Einschränkungen ergeben sich in einer sorgfältigen Auswahl kompatibler Ligationsstellen, in der Notwendigkeit der Synthese einzelner Fragmente als Peptidester und durch die Beschränkung auf kurze Fragmente [95].

Durch das Einführen der Mutationen K60E/N143H/E151H/D189K in den Wildtyp des anionischen Rattentrypsins gelang es ebenfalls eine Peptidligase zu generieren, die in wässrigen Systemen Peptidbindungen knüpft [96]. Bei diesem Enzym, welches unter dem Namen Trypsiligase bekannt ist [97], konnte die native proteolytische Aktivität gegenüber positiv geladenen Aminosäureseitenketten nahezu vollständig in den Hintergrund gedrängt werden. Eingeführt wurde stattdessen eine restriktive proteolytische Aktivität gegenüber der Erkennungssequenz YRH sowie eine hohe Transpeptidaseaktivität [97]. Die native Erkennung von positiv geladenen Aminosäureseitenketten (Lysin, Arginin) im S1-Bindungsort von *wt*-Trypsin, die durch eine Salzbrücke zur negativ geladenen Asparaginsäureseitenkette 189 vermittelt wird, wurde durch deren Austausch gegen eine Lysinseitenkette unterbunden. Diese ragt durch eine Konformationsänderung nicht mehr in den Bindungsort hinein [98, 99]. Basierend auf ausgedehnten Esterhydrolysestudien hat sich eine Präferenz für Tyrosinseitenketten an P1-Position herausgestellt [100]. Postuliert wird eine Einbindung und Stabilisierung der Hydroxylgruppe der Tyrosinseitenkette in P1-Position durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonylsauerstoffatomen der Glycine 216, 219 und 226 [99]. Der Austausch der Lysinseitenkette an Position 60 gegen eine saure Glutaminsäureseitenkette bewirkt eine Präferenz für Argininseitenketten in P1'-Position, welche über eine Salzbrücke vermittelt wird [101]. Eine Akzeptanz des 4-Guanidinophenylesters wird somit trotz der Mutation D189K

ebenfalls realisiert, wobei hier gegensätzlich zum *wt*-Trypsin eine Einbindung der Esterabgangsgruppe in den S1'-Bindungsort postuliert wird [96, 97].

Sowohl die Asparaginseitenkette an Position 143 als auch die Glutaminsäureseitenkette an Position 151 im S2'-Bindungsort wurde durch eine Histidinseitenkette ausgetauscht. Diese beiden Mutationen bewirken eine über zweiwertige Metallionen (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}) vermittelte Akzeptanz für Substrate mit P2'-Histidinen [97, 102].

Weniger als 1,6 % der Proteine der *SwissProt*-Datenbank [103] (eigene Recherche) weisen eine Präsenz der Erkennungssequenz YRH auf, was unerwünschte proteolytische Spaltungen der Zielproteine im Rahmen von Modifizierungsreaktionen nahezu ausschließt. Das Herzstück der Trypsiligase ist zudem eine substrataktivierte Katalyse. Erst durch Einbindung des Substratmoleküls mit spezifischer Erkennungssequenz in das aktive Zentrum wird die aktive Konformation des Biokatalysators vollständig ausgebildet [97]. Trypsiligase-vermittelt konnten sowohl irreversible *N*- als auch reversible *C*-terminale Proteinmodifizierungen gezeigt werden [96, 97, 104].

In Abbildung 1.3 ist schematisch der Verlauf einer Substratmimetika-vermittelten Trypsiligase-katalysierten *N*-terminalen Modifizierungsreaktion dargestellt.

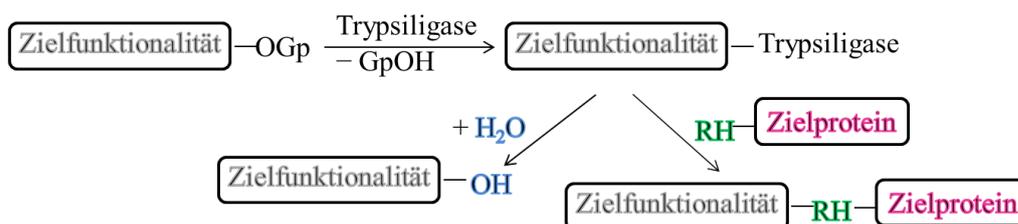


Abbildung 1.3: Substratmimetika-vermittelte *N*-terminale Modifizierung eines Proteins katalysiert durch die Trypsiligase.

In einem ersten Schritt wird die Trypsiligase durch das mit einer Zielfunktionalität versehene Substratmimetikum acyliert, wodurch es zur Ausbildung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates kommt. Die Deacylierung des Acyl-Enzyms erfolgt durch das mit der RH-Sequenz versehene Zielprotein, wodurch dieses am *N*-Terminus modifiziert wird. Durch die Verwendung eines Substratmimetikums werden bei der *N*-terminalen Modifizierungsreaktion quantitative Ausbeuten und irreversible Reaktionsverläufe erzielt [97].

Im Gegensatz zur gezeigten *N*-terminalen Modifizierung erfolgt die *C*-terminale Modifizierung über eine Transamidierungsreaktion. Ein schematischer Verlauf einer solchen *C*-terminalen Modifizierung ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

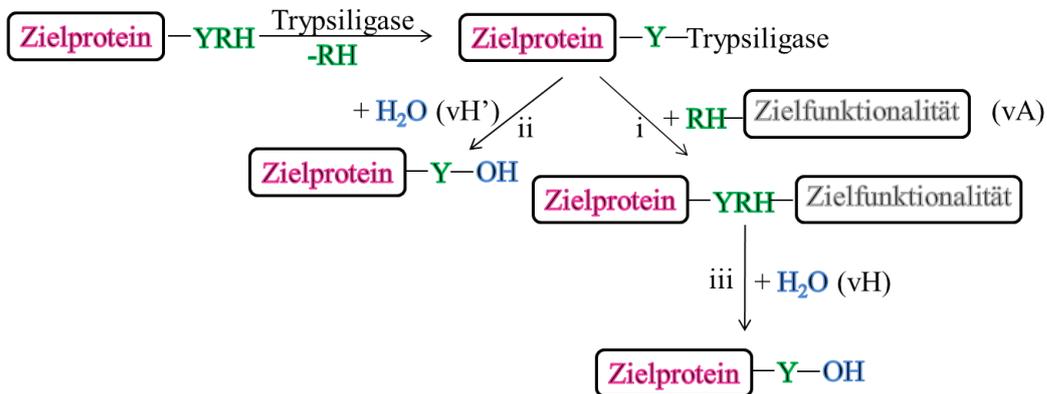


Abbildung 1.4: Schema einer *C*-terminalen Proteinmodifizierung über eine Transamidierungsreaktion katalysiert durch die Trypsiligase (Schema erweitert nach: H. Jakubke [82]. vH : initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit, vH' : initiale Primärhydrolysegeschwindigkeit, vA : initiale Aminolysegeschwindigkeit).

Für die *C*-terminale Modifizierungsreaktion wird das Zielprotein am *C*-Terminus mit der YRH-Erkennungssequenz versehen, die beliebig um ausgewählte Affinitätsfusionen erweitert werden kann. Das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat aus Trypsiligase und Zielprotein wird durch die Spaltung der Erkennungssequenz gebildet. Dieses kovalente Acyl-Enzym-Intermediat wird nachfolgend von der α -Aminofunktion der RH-Sequenz einer variablen Zielfunktionalität nukleophil angegriffen und deacyliert, wodurch das gewünschte Produkt gebildet wird (Reaktion i, Aminolyse). Wie anhand Abbildung 1.4 ersichtlich ist, wird durch die Transamidierungsreaktion erneut die Trypsiligase-spezifische Sequenz YRH im Produkt generiert. Eine strikte Diskriminierung zwischen Acyldonorsubstrat und Transamidierungsprodukt durch die Trypsiligase ist somit nicht möglich. Die Möglichkeit der Hydrolyse dieser Erkennungssequenz (Reaktion iii, Sekundärhydrolyse [87]) bedingt das Durchlaufen eines temporären Maximums der Produktausbeute. Zusätzlich kann das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat durch Wassermoleküle nukleophil angegriffen und deacyliert werden (Reaktion ii, Primärhydrolyse), was zu einer Verringerung der Konzentration an Acyldonor führt, da das gebildete Hydrolyseprodukt kein Substrat mehr für die Synthesereaktion darstellt. Die Hydrolyse des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates steht hierbei in Konkurrenz zu dessen Aminolyse. Trotz der angesprochenen Möglichkeit der Produkthydrolyse und damit der Bildung instabiler Transamidierungsprodukte ist eine Trypsiligase-katalysierte *C*-terminale Proteinmodifizierungsreaktion für die Anwendung von großer Bedeutung. Beispielsweise konnten Fab-Fragmente mit einem Tetrazin-Derivat und Ausbeuten von ca. 70 % *C*-terminal ohne Funktionsverlust der Fab-Fragmente modifiziert werden [105], was die Anwendbarkeit dieses

Biokatalysators für solche Reaktionen eindrucksvoll zeigt. Im Hinblick auf eine gezielte und hochselektive Modifizierung diagnostischer und therapeutischer Antikörper stellt die Optimierung der Trypsiligase speziell im Hinblick auf verminderte Sekundärhydrolysegeschwindigkeiten einen lohnenswerten Ansatz dar, da dies im Rahmen von C-terminalen Proteinmodifizierungsreaktionen zu stabileren Produkten führt. Zur Optimierung der Trypsiligase stehen im Rahmen des *Enzyme Engineerings* evolutive Ansätze generell zur Verfügung.

1.2.3.1.2 Evolutives Enzymdesign

Die direkte Evolution eines Enzyms ist eine leistungsstarke Methode, um Eigenschaften von Biokatalysatoren an gewünschte Anforderungen anzupassen [106]. Im Unterschied zum rationalen Design ist eine detaillierte Kenntnis über Struktur-Wirkungsbeziehungen nicht zwingend notwendig [107]. Grundlage einer direkten Evolution ist das Darwin'sche Prinzip aus Mutation und Selektion. Ausgangspunkt für die direkte Evolution eines Biokatalysators ist die Herstellung einer Enzym-Bibliothek auf DNA-Ebene, gefolgt von der Generierung einer zweiten auf Proteinebene mit einem anschließenden *Screening*- oder Selektionsverfahren zur Auswahl neuartiger Biokatalysatoren [107]. Eine schematische Darstellung des beschriebenen Ablaufs ist in Abbildung 1.5 gezeigt.

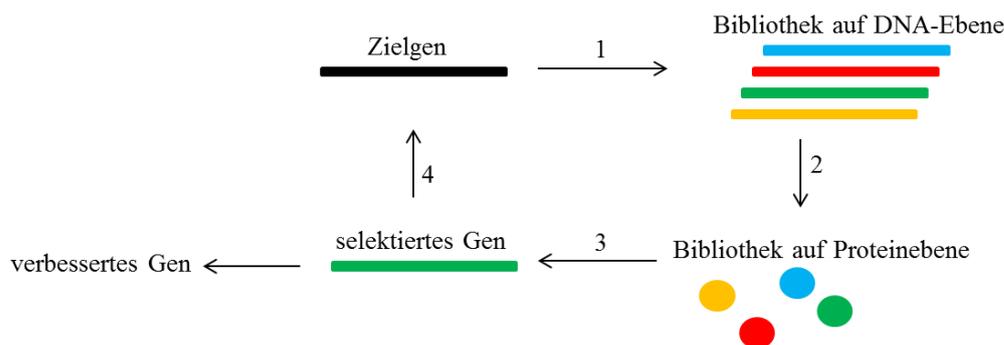


Abbildung 1.5: Schematischer Ablauf einer gerichteten Evolution zur Selektion optimierter Biokatalysatoren [108]. 1: Zufällige Mutationen, 2: Proteinexpression in geeignetem Expressionssystem, 3: Selektion/*Screening*, 4: Weitere Runde.

Die Methoden der Bibliotheksklonierung auf DNA-Ebene können in drei Kategorien eingeteilt werden [109], wobei prominente Vertreter der einzelnen Gruppen im Folgenden kurz erläutert werden. Die erste Kategorie umfasst Methoden zur Randomisierung infolge einer absichtlich fehlerhaften Amplifizierung der Zielstruktur. Durch die Nutzung physikalisch oder chemisch mutagener Agenzien (z. B. UV-Licht oder Alkylierungsmittel) wird eine korrekte Amplifizierung der Zielstruktur ebenso unterbunden wie durch die Verwendung kommerziell erhältlicher *Mutator Strains*, die Defekte in den DNA-Reparaturmechanismen aufweisen [109]. Die Methode der *Random Insertion/Deletion Mutagenesis* (RID) erlaubt das willkürli-

che, simultane Einfügen und Entfernen von Basen an zufälligen Stellen [110]. Das prominenteste Beispiel dieser Kategorie ist sicherlich die *Error Prone*-PCR, die auf dem Einbau falscher Basen oder einer verringerten *Proofreading*-Aktivität der Polymerase beruht. Durch die Verwendung von Manganionen anstelle von Magnesiumionen als Cofaktor der Polymerase und einer Überpräsentation bestimmter dNTPs kann die Fehlerrate im Rahmen der PCR deutlich gesteigert werden [109]. Die Verwendung von Manganionen führt hierbei zu einer verminderten Diskriminierung der Polymerase zwischen einzelnen Deoxynukleotiden und zu einer verminderten *Proofreading*-Aktivität der Polymerase [111]. Durch diese Methode konnte beispielsweise eine Mutationsrate von bis zu 2 % durch eine Anpassung der Mangan- sowie Nukleotidkonzentration erreicht werden [112]. Speziell für diese Anwendung entwickelte Polymerasen sind mittlerweile kommerziell erhältlich (Agilent Technologies [113]), was die Bedeutung dieser Methode zur Generierung von Bibliotheken auf DNA-Ebene unterstreicht.

Die zweite Kategorie umfasst Methoden einer kontrollierten Randomisierung an spezifischen Stellen der Zielstruktur [109]. Diese Methoden beruhen alle auf der Inkorporation eines randomisierten, synthetischen DNA-Fragmentes in die Zielstruktur. Hierbei ist sowohl die Verwendung synthetisch hergestellter und bereits randomisierter Genfragmente denkbar [114], als auch die Verwendung degenerierter Primer, die eine Inkorporation der 4 möglichen Basen im Rahmen einer PCR bedingen. Beispielhaft ist hier die Verwendung von NNK³-Oligonukleotiden zu nennen [115]. In der Literatur werden zudem zahlreiche Erweiterungen und Optimierungen dieser Methoden beschrieben [109]. Bei der Vervollständigung der randomisierten Sequenzen zu Vollängenkonstrukten ist eine möglichst geringe Konzentration an *wt*-Zielstruktur eine wichtige Voraussetzung. Weit verbreitet ist hierbei die Technik der *Overlap Extension* [116] sowie die Anwendung QuickChange[®]-basierter Systeme. Auch hier ist eine Fülle weiterer Techniken in der Literatur beschrieben [109]. Die dritte Kategorie umfasst Methoden der *in vitro*-Rekombinationstechnik, wobei einzelne Genfragmente neu verknüpft werden [109]. Im Rahmen des DNA-*Shufflings* als prominentester Vertreter der homologen Rekombinationstechnik werden homologe Gene unterschiedlichen Ursprungs enzymatisch fragmentiert und anschließend in einer PCR-ähnlichen Reaktion ohne Zugabe exogener Primer zusammengeführt [117, 118]. Weitere ausgewählte Methoden, die ebenfalls auf einer Rekombination zuvor fragmentierter Gensequenzen beruhen, sind die RACHITT- [119] (*random chimeragenesis on transient templates*) und ITCHY- (*iterative truncation for the creation of hybrid enzymes*) Methode, wobei letztere eine Homologie-unabhängige Methode

³ N – ATGC, K – GT

dargestellt [109]. Bei der RACHITT-Methode wird ein parentaler DNA-Strang als Template verwendet, wobei ein Uracil-haltiger komplementärer Strang generiert wird. Zu diesem Uracil-haltigen Strang komplementäre parentale DNA-Sequenzen werden fragmentiert und anschließend mit diesem hybridisiert. Nicht-hybridisierte Enden werden mit Hilfe von Exonukleasen abgebaut und vorhandene Lücken durch Polymerasen aufgefüllt und ligiert. Der Uracil-haltige parentale DNA-Strang wird durch die Uracil-DNA-Glykosylase behandelt, was eine nicht-amplifizierbare Sequenz zur Folge hat. Der chimäre Strang kann abschließend in einer PCR zu einem Doppelstrang aufgebaut werden [119]. Resultierende Bibliotheken der ITCHY-Methode beinhalten Zielsequenzen mit deletierten Basenpaaren. Zwei nicht-homologe Gene werden dazu kontrolliert mit Exonuklease III verdaut und anschließend religiert [120, 121]. Durch die Methode des StEP (*staggered extension process*) kann eine Fragmentierung der parentalen DNA umgangen werden. Zu Beginn werden kurze Primer durch deren Anlagerung an denaturierte parentale DNA in einer PCR verlängert. Durch Verwendung sehr kurzer Verlängerungszeiten und Zyklen aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung kommt es zum Aufbau von Vollängenkonstrukten. Eine Anlagerung schrittweise verlängerter Primersequenzen an unterschiedliche, homologe parentale DNA-Sequenzen bedingt deren Rekombination [122–124]. Auch auf dem Gebiet der *in vitro*-Rekombinationstechniken gibt es zahlreiche, in der Literatur beschriebene Erweiterungen und Kombinationen bereits bekannter Techniken [109, 121].

Steht eine Bibliothek auf DNA-Ebene zur Verfügung, gilt es aus einem Pool an Proteinen (der Bibliothek auf Proteinebene) solche zu isolieren, die die gewünschten Eigenschaften enthalten. Dieser kritische Schritt setzt das Vorhandensein geeigneter *Screening*- oder Selektionsverfahren voraus [106], welche genau an die gewünschten Eigenschaften des Biokatalysators angepasst werden müssen [125].

Ein *Screening* basiert auf der Analyse einzelner Gene oder Klone [126] und ist beschränkt auf eine Bibliotheksgröße von etwa 10^4 Klonen [106]. Im Rahmen einer Selektion kann der ganze Pool von Genen bzw. Klonen einer Bibliothek (Größe $\geq 10^7$ Klone [127]) analysiert werden [106, 126], wobei eine Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp der Zielstruktur Bedingung beider Methoden ist [106]. Unterschieden wird weiterhin zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Selektionsverfahren. *In vivo*-Methoden zeichnen sich durch das Einbringen der Bibliothek auf DNA-Ebene in ein geeignetes Zellsystem aus. Die Selektion basiert hier auf einer Verknüpfung zwischen Vorteilen im Zellwachstum und der Enzymaktivität nach dem Motto „*Survival of the Fittest*“ [128]. Mögliche Limitationen ergeben sich in diesem Fall durch die Transfor-

mationseffizienz, durch das Übergehen von Selektionsdrücken durch die Zellsysteme, sowie durch einen eventuell notwendigen Substrattransport in die entsprechenden Zellsysteme [106]. *In vitro*-Selektionsverfahren hingegen umgehen die angesprochenen limitierenden Faktoren. Sie benötigen kein Zellsystem und können somit unter stringenteren, unphysiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Das bekannteste System, neben anderen Display-Arten wie dem *Cell Surface Display* und dem *Ribosome Display*, ist sicherlich das *Phage Display* [106, 127]. Das *Phage Display*-Verfahren und die Bedeutung dieses Systems für die Optimierung von Biokatalysatoren soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.3 Leistungsmerkmale des *Phage Display*-Verfahrens

Das *Phage Display*-Verfahren (erstmalig beschrieben 1985 von Georg Smith [129]) als *in vitro*-Selektionsmethode ermöglicht die Auswahl von Polypeptiden und Proteinen aus einer Vielzahl von Varianten, die auf der Oberfläche filamentöser Phagen präsentiert werden. *Phage Display* ist eine leistungsstarke Methode sowohl zur Identifizierung von Polypeptiden mit neuen Eigenschaften als auch zur Optimierung von Proteinen und Enzymen [130], wobei die Anzahl selektierbarer Protein- bzw. Polypeptidvarianten bei $> 10^9$ liegt [131]. Ausgangspunkt ist auch hier eine Bibliothek auf DNA-Ebene, für deren Generierung unter anderem die bereits beschriebenen Methoden zur Verfügung stehen (Kapitel 1.2.3.1.2). Die Erzeugung der Bibliothek auf Proteinebene (Phagenbibliothek) erfolgt im Rahmen des *Phage Displays* durch die Fusionierung des Zielproteins oder -peptids mit einem Phagenhüllprotein. Diese Fusionierung erfolgt dabei bereits auf DNA-Ebene. Die Expression der notwendigen Proteine für die Phagenassemblierung sowie die Assemblierung selbst erfolgt in geeigneten *E. coli*-Zellen. Generell eignet sich jedes Hüllprotein eines filamentösen Phagen zur Präsentation von Proteinen oder Peptiden [130], wobei das am häufigsten verwendete Protein sicherlich das pIII-Hüllprotein ist, an dessen *N*-Terminus die jeweilige Zielstruktur fusioniert werden kann. Das pIII-Protein liegt in 3 bis 5 Kopien auf der Phagenoberfläche vor [127] und wird signalsequenzvermittelt über den SEC-Proteintranslokationsweg in das Periplasma von *E. coli*-Zellen transportiert [132]. Im Zuge der Phagenassemblierung an der inneren Zellmembran wird das Proteinkonstrukt, bestehend aus Zielstruktur und Hüllprotein bzw. dessen Domäne, in den Phagen eingebaut und die Zielstruktur auf der Oberfläche des Phagen präsentiert [133]. Ein solcher rekombinanter Phage ist in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt.

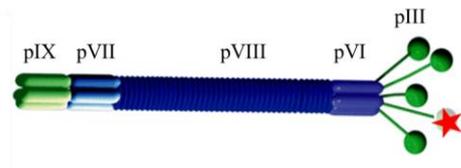


Abbildung 1.6: Rekombinanter Phage: Das Sternchen symbolisiert das Zielprotein als Fusion mit einer Kopie der C-terminalen Domäne des pIII-Proteins. pIX, pVII, pVIII, pVI und pIII sind Phagenüllproteine [134].

Befindet sich das Zielgen auf einem Phagenvektor, welcher sämtliche Phagenproteine auf DNA-Ebene enthält, führt die Generierung der Bibliothek auf Proteinebene zu einem polyvalenten *Display*. Die Verwendung eines Phagemids, welcher nur für die Fusion aus Zielstruktur und Hüllprotein codiert, bedingt ein monovalentes *Display* [130], wobei das *Displaylevel* bei 1–5 % liegt und somit 95–99 % der pIII-Proteine in ihrer nativen Struktur vorliegen [127, 130].

Die Auswahl optimierter Zielstrukturen im Anschluss an die Herstellung einer Bibliothek auf Proteinebene kann in mehrere Teilschritte gegliedert werden. Diese sind in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt.

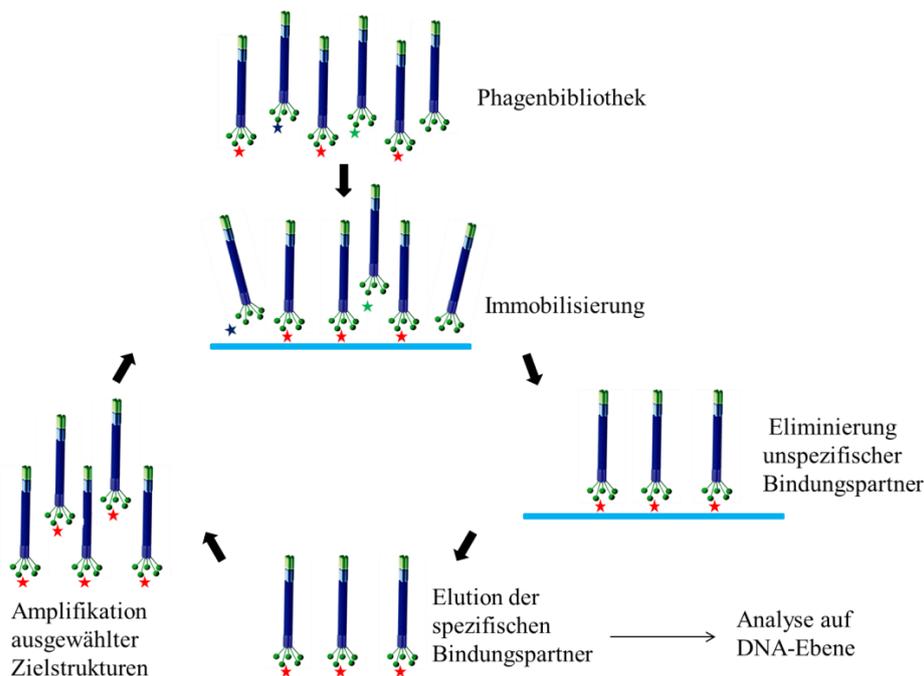


Abbildung 1.7: Schematischer Ablauf einer Auswahl optimierter Zielstrukturen ausgehend von einer Bibliothek auf Proteinebene (Phagenbibliothek) [134, 135].

Zunächst erfolgt eine Immobilisierung der rekombinanten Phagen durch spezifische Wechselwirkungen der Zielstruktur mit einem entsprechend der Zielstellung angepassten Träger. Unspezifische Bindungspartner werden durch Waschschritte eliminiert, spezifische Bindungspartner im Nachgang durch angepasste Bedingungen eluiert und eventuell auf

DNA-Ebene analysiert. Die eluierten Bindungspartner können alternativ nach Amplifikation einer neuen Auswahlrunde mit erhöhtem Selektionsdruck zugeführt werden.

Das größte Anwendungsgebiet des *Phage Display*-Verfahrens liegt in der Suche nach neuen Bindungspartnern für ausgewählte Zielstrukturen. Die Identifizierung von Peptiden, die an bestimmte Zielstrukturen binden, sowie die Identifizierung hochaffiner Antikörper stellt hierbei die meist verwendete und kommerziell bedeutendste Anwendung dar [127, 132]. Die Anreicherung Bindungspartner-präsentierender rekombinanter Phagen erfolgt dabei wie in Abbildung 1.7 beschrieben durch eine Affinitätsselektion. Dieses *Panning* erfolgt meist in drei Runden mit erhöhter Stringenz. Die Suche nach verbesserten und neuen DNA-Bindeproteinen [136] sowie nach Proteinen mit erhöhter Stabilität beispielsweise gegenüber proteolytischer Degradierung [137] oder thermischer Denaturierung [138] gehört jedoch genauso zu dem Anwendungsgebiet des *Phage Displays* wie die Untersuchung von Faltungsereignissen von Proteinen [139–141], die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen [142–144] und die Aufklärung posttranslationaler Modifizierungen ausgewählter Proteine [145]. Als weiteres Anwendungsgebiet ist das *Enzyme Engineering* zur Optimierung, Anpassung und Modifizierung von Katalysemechanismen zu nennen [127, 146, 147]. *Phage Display*-Studien wurden daher auch am anionischen Rattentrypsin durchgeführt [135, 148]. Hierbei gelang es anhand immunologischer Nachweisverfahren zu zeigen, dass das *wt*-Trypsin als Fusionsprotein sowohl mit der C-terminalen Domäne des pIII-Hüllproteins als auch des pVIII-Hüllproteins auf einem Phagen präsentiert werden kann. Vergleichende Aktivitätsstudien bestätigten eine korrekte Disulfidverbrückung sowie eine native Faltung, da die korrespondierenden Umsatzgeschwindigkeiten zwischen präsentiertem und nicht-präsentiertem *wt*-Trypsin vergleichbar waren. Die durchgeführten Aktivitätsstudien basierten dabei auf einer Esterhydrolyse bzw. einer proteolytischen Spaltung eines Peptidsubstrates [135, 148]. Die Mutante H57A des anionischen Rattentrypsins rückte ebenfalls in den Fokus von *Phage Display*-Studien. Die Umsatzgeschwindigkeiten bei dieser Mutante sind im Verhältnis zu *wt*-Trypsin um einen Faktor 10.000 herabgesetzt [149]. Jedoch können spezifisch His-Lys- bzw. His-Arg-Erkennungssequenzen gespalten werden [150]. Immunologische Nachweisverfahren bestätigten auch hier eine erfolgreiche Präsentation der Mutante als Fusionsprotein mit der C-terminalen Domäne des pIII-Hüllproteins. Eine Aktivität über die proteolytische Spaltung eines Fluoreszenzsubstrates konnte ebenfalls gezeigt werden [149]. Die Generierung einer Mutante mit einer persistierenden restriktiven proteolytischen Aktivität gegenüber His-Lys- und His-Arg-Motiven bei gleichzeitig gesteigerter Umsatzgeschwindigkeit im Vergleich zur H57A-Mutante konnte im Rahmen dieser Studie jedoch nicht realisiert werden [149]. Die limitierte Literatur im Hin-

blick auf *Phage Display*-Projekte mit Proteasen zur Optimierung bzw. Modifizierung deren katalytischer Eigenschaften zeugt zudem von einer anspruchsvollen Methode des *Enzyme Engineerings*. Besonders an das Auswahlverfahren werden hohe Ansprüche gestellt [149], was durch die nicht erfolgreiche Optimierung der H57A-Mutante verdeutlicht wird. Mögliche Limitationen auf die erfolgreiche Durchführung des geplanten *Phage Display*-Projektes können weiterhin nicht immer im Vorfeld determiniert werden [149]. Für eine simultane Analyse einer Vielzahl an Enzymvarianten stellt jedoch das *Phage Display* die Methode der Wahl dar. Die positiven Ergebnisse der *Phage Display*-Projekte des anionischen Rattentrypsins (*wt*) und der H57A-Mutante hinsichtlich Aktivität und genereller Anwendbarkeit ließen die Methode des *Phage Displays* für die Optimierung der Trypsiliginase jedoch lohnenswert erscheinen.

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die initiale Etablierung des *Phage Display*-Verfahrens für Optimierungsstudien der Trypsiligase. Im Rahmen der Etablierung des *Phage Display*-Verfahrens sollte beispielhaft die Sekundärhydrolyseaktivität der Trypsiligase reduziert werden, was in stabileren Transamidierungsprodukten resultiert (Kapitel 1.2.3.1.1). Annahme war, dass dieses Ziel durch die Generierung von Trypsiligasevarianten mit einem artifiziellen hydrophoben Cluster im aktiven Zentrum erreicht werden kann. Das hydrophobe Cluster sollte das Eindringen von hydrolytisch aktiven Wassermolekülen in das aktive Zentrum sowie den Verbleib vorhandener Wassermoleküle im aktiven Zentrum erschweren, wie es für die Sortase A beschrieben ist. Wassermoleküle werden nicht mehr effizient in das aktive Zentrum der Sortase A eingebunden, was eine Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates durch den nukleophilen Angriff von Wassermolekülen erschwert [71]. Im aktiven Zentrum vorhandene Wassermoleküle werden in Anwesenheit peptidischer Nukleophile zudem aus diesem verdrängt und stehen somit für die Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates nicht mehr zur Verfügung [65]. Vergleicht man das aktive Zentrum der Sortase A mit dem des anionischen Rattentrypsins wird deutlich, dass das aktive Zentrum der Sortase A überwiegend hydrophobe Bereiche aufweist (Abbildung 2.1). Das aktive Zentrum des anionischen Rattentrypsins hingegen weist überwiegend hydrophile Bereiche auf.

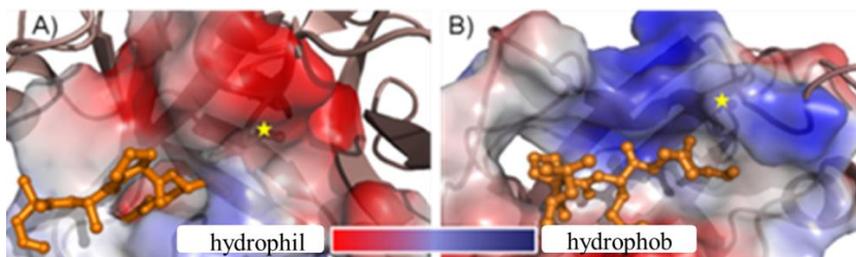


Abbildung 2.1: Vergleich des aktiven Zentrums von anionischem Rattentrypsin (A) mit dem der Sortase A aus *Staphylococcus aureus* (B). Stern: Ser195 des Trypsins bzw. Cys184 der Sortase A, Pdb: 1brb (anionisches Rattentrypsin II) und 1ija (Sortase A). Quelle: Dr. Sandra Liebscher.

Unter Kapitel 1.2.3 wurden jedoch bereits Nachteile bei der Verwendung der Sortase A als Biokatalysator für Proteinmodifizierungen aufgezeigt. Diese sind unter anderem ein hoher Enzymbedarf [70] und lange Reaktionszeiten [61]. Deutlich wird der Vorteil eines geringeren Enzymbedarfs bei Trypsiligase-katalysierten Proteinmodifizierungen gegenüber Sortase A-katalysierten Proteinmodifizierungen bei Betrachtung korrespondierender Reaktionen an vergleichbaren Zielstrukturen in Form von anti-HER2 Fab-Fragmenten. Sortase A-katalysiert wurden im Verhältnis zum Fab-Fragment äquimolare Mengen an Enzym eingesetzt [151], Trypsiligase-katalysiert jedoch nur 0.1 Äquivalent [104]. Aufgrund der bereits gezeigten

Nachteile der Sortase A gegenüber der Trypsiligase als Biokatalysator für Proteinmodifizierungen sollte die hohe Aktivität und Spezifität der Trypsiligase mit der geringen Hydrolyseaktivität der Sortase A kombiniert werden, was in einem effizienten Biokatalysator für C-terminale Proteinmodifizierungen resultieren sollte. Um einen solchen Biokatalysator identifizieren zu können, galt es im Rahmen dieser Arbeit, das *Phage Display*-Verfahren als solches für Optimierungsstudien der Trypsiligase initial zu etablieren und somit erstmalig eine geeignete Selektionsmethode zu entwickeln und zu optimieren. Die Selektion sollte über den Substratumsatz und weiterführend über das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat als Selektionsstruktur erfolgen. Dieses Intermediat stellt im Rahmen des Katalysemechanismus der Trypsiligase eine Schlüsselfunktion dar, da die Deacylierung des Enzyms in diesem Schritt durch Wasser oder durch ein peptisches Substrat erfolgen kann. Über dieses Intermediat als Selektionsstruktur sind daher vielfältige Optimierungen der Trypsiligase denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten weiterführend unter Verwendung der entwickelten und optimierten *Phage Display*-basierten Selektionsmethode Biokatalysatoren aus einer Bibliothek an Trypsiligasevarianten identifiziert werden, die eine – im Vergleich zur Trypsiligase – verminderte Sekundärhydrolysegeschwindigkeit aufweisen. Da ein stabiles, hydrolyseunanfälliges kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat Bedingung für eine reduzierte Sekundärhydrolysegeschwindigkeit sein kann, sollte auf genau diese Eigenschaften des Intermediates selektiert werden. Zur abschließenden Prüfung der erfolgreichen Etablierung des *Phage Display*-Verfahrens und der Selektionsmethode zur Trypsiligaseoptimierung sollten die erhaltenen Trypsiligasevarianten enzymologisch sowohl unter Verwendung von peptidischen als auch von proteinogenen Substraten charakterisiert werden. Eine mögliche verminderte Sekundärhydrolysegeschwindigkeit einhergehend mit einer Stabilisierung der Transamidierungsprodukte sollte dabei im Fokus stehen. Für die Entwicklung, Optimierung und Etablierung der Selektionsmethode galt es weiterhin, essentielle Punkte erfolgreich umzusetzen, die im Rahmen eines evolutiven Ansatzes mittels *Phage Display* zur Enzymoptimierung notwendig sind. Initial galt es daher, geeignete Randomisierungsstellen innerhalb der Primärstruktur der Trypsiligase auszuwählen, sowie die Klonierung einer Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene zu realisieren. Zufällige Mutationen sollten hierbei durch die Verwendung von NNK⁴-Oligonukleotiden in das Zielgen eingeführt werden. Im Anschluss an die Bereitstellung der Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene sollte eine Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf Proteinebene generiert werden, die für die Entwicklung, Optimierung und Etablierung der Selektionsmethode eingesetzt werden sollte.

⁴ N – ATGC, K – GT

3 Verwendete Materialien und Geräte

3.1 Kits, Chemikalien, Standards und Enzyme

Alle verwendeten Reagenzien entsprachen der Kategorie „*pro analysis*“ und wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und AppliChem GmbH (Darmstadt) kommerziell erworben. Polymerasen, Ligasen und Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) bezogen. Enterokinase zur Aktivierung der zymogenen Vorstufe der Trypsiligasevarianten wurde von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bezogen. Als Proteinstandard wurde überwiegend der *Page Ruler™ (prestained)* von Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA) oder der *Protein Molecular Weight Marker PS10 (prestained)* von GeneOn (Ludwigshafen am Rhein) verwendet. Als DNA-Standard wurde sowohl der *Gene Ruler™* (100 bp, 1 kb) von Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham/USA) als auch der *Quick Load®* DNA-Standard (100 bp, 1 kb) der Firma New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) eingesetzt. Die Visualisierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Zugabe von *SYBR® Safe DNA gel stain* von Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA) als Fluoreszenzfarbstoff unter Verwendung von UV-Licht. Für die Selektionsverfahren von Trypsiligasevarianten wurden *SigmaScreen™ Streptavidin High Capacity Coated 96-well plates* und *Streptavidin immobilized on 4% beaded agarose* der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) verwendet. Die Helferphagen M13KO7 wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen. Folgende *Kits* kamen zur Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten zur Anwendung: EZ-Hefetransformationskit (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg), *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

3.2 Peptide und Substrate

Die in Tabelle 3.1 aufgeführten Peptide für Charakterisierungsstudien sowie Substrate für die Selektionsverfahren wurden freundlicherweise von Dipl.-Biochem. Christoph Meyer, Dipl.-Biochem. Lars Franke, Dr. Bianka Hartrodt und Frau Steffanie Kaufmann der MLU Halle-Wittenberg in gereinigter Form zur Verfügung gestellt oder sie wurden der Stammsammlung entnommen. Für die Peptidsynthese wurden herkömmliche Festphasen-Strategien mit Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) und tert-Butyl (tBu) geschützten Aminosäure-Derivaten verwendet. Die Aktivierung erfolgte mit *O*-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-

tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU). Die verwendeten Aminosäuren und Reagenzien für die Synthesen wurden von IRIS Biotech GmbH (Marktrechwitz) bezogen. Nach der Synthese wurden die Peptide und Substrate mittels RP-HPLC (H₂O/ACN/0,1 % TFA/Gradientenelution) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet. Die Synthese des RHAK(CF) Peptides erfolgte wie bereits beschrieben [104]. Die Reinheit der verwendeten Peptide und Substrate wurde mittels HPLC-Analyse bei entsprechender Wellenlänge (220 nm bzw. 254 nm) ermittelt. Eine Reinheit von > 95 % wurde dabei bestätigt. Die Identität der Peptide und Substrate wurde massenspektrometrisch bestätigt.

Tabelle 3.1: Verwendete Peptide und Substrate inklusive einer Zusammenstellung der Ergebnisse massenspektrometrischer Untersuchungen. Die theoretisch berechneten Masse-zu-Ladungsverhältnisse m/z_{ber} sind den gefundenen m/z_{gef} gegenübergestellt.

Peptid/Substrat	m/z_{ber}	m/z_{gef}
Bz-AAYRHAG	848,9	$850,0 \pm 1 (M + H^+)$;
Bio(PEG) ₂ -GAAYRHAAG	1389,2	$695 \pm 1 (M + 2H^+/2)$; $464 \pm 1 (M + 3H^+/3)$
RHAADapAbz	658,7	$659 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AALRHAG	798,9	$799,9 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAMRHAG	816,9	$817,9 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAYKHAG	820,9	$821,8 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAFKHAG	804,9	$805,8 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAFRHAG	832,9	$833,9 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAYRNAG	825,9	$826,9 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAIRHAG	798,9	$799,9 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAYRRAG	868,0	$868,9 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAYRAAG	782,9	$783,8 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AADRHAG	800,8	$801,8 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AARRHAG	841,9	$422,1 \pm 1 (M + 2H^+/2)$
Bz-AAARHAG	756,8	$757,8 \pm 1 (M + H^+)$
Bz-AAWRHAG	872,0	$873,0 \pm 1 (M + H^+)$
RHAK	510,6	$511,7 \pm 1 (M + H^+)$
RHAK(CF)	868,9	$870,0 \pm 1 (M + H^+)$

Die Struktur des verwendeten Bio(PEG)₂-Bausteins ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

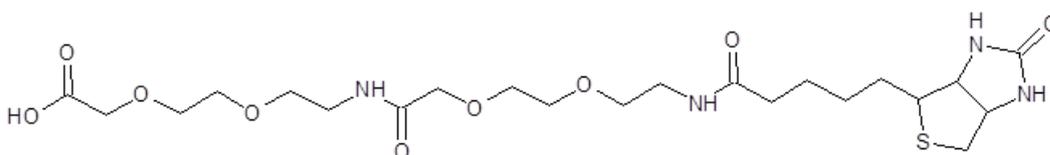


Abbildung 3.1: Struktur des verwendeten Bio(PEG)₂-Bausteins.

3.3 Geräte

Sedimentationsschritte und weitere Zentrifugationsschritte von Volumina ≥ 2 ml wurden mittels einer Allegra[®]-X-15R-Zentrifuge der Firma Beckman Coulter GmbH (Krefeld) durchgeführt. Es kamen der Anwendung entsprechend die Rotoren SX4750A (maximal 5250 g) und FX6100 (maximal 11400 g) zur Anwendung. Für die Sedimentationsschritte bei Verwendung

von Volumina ≤ 2 ml kam eine *Biofuge fresco* der Firma Heraeus (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA) zum Einsatz. Proteinkonzentrationen wurden am Nanophotometer der Firma Implen GmbH (München) bestimmt. Die Auftrennung von DNA-Proben erfolgte mittels der *Mini-Sub[®] Cell GT* (Bio-Rad, München) mit entsprechender Spannungsquelle *PowerPac[™] Basic Power Supply* (Bio-Rad, München). Ein *Multiporator[®]* der Firma Eppendorf (Hamburg) kam bei Elektroporationen zum Einsatz. Für die SDS-Gelelektrophorese wurde die Apparatur *Mini-Protean[®]* (Bio-Rad, München) mit entsprechender Spannungsquelle *PowerPac[™] Basic Power Supply* (Bio-Rad, München) verwendet. Massenspektrometrische Untersuchungen wurden an der *Waters Micromass ZQ (ESI MS single quadropol)* der Firma Waters GmbH (Eschborn) mit entsprechender Software *MassLynx* durchgeführt. HPLC-basierte Analysen wurden an der *Waters Breeze[™]* Anlage mit entsprechender Software unter Verwendung einer *GRACE VYDAC[®]* (Grace Davison Discovery Sciences, Lokeren/Belgien) C18-Säule (5 μ m, 4,6 \times 250 mm) durchgeführt. UPLC-basierte Analysen erfolgten an einem *Acquity Ultra Performance Liquid Chromatographie System* mit entsprechender Software und einer BEH300-C18-Säule (1,7 μ m, 2,1 \times 50 mm) der Firma Waters GmbH (Eschborn). Die Inkubation von Reaktionsansätzen erfolgte im *Thermomixer comfort* der Firma Eppendorf (Hamburg). Streulichtexperimente wurden an einem Lumineszenz-Spektrometer LS 50B von PerkinElmer (Rodgau) durchgeführt. CD-spektroskopische Untersuchungen wurden an einem J810-*Spectropolarimeter* der Firma Jasco Germany GmbH (Groß-Umstadt) durchgeführt. Die Inkubation von *E. coli*- bzw. *S. cerevisiae*-Kulturen erfolgte im *Minitron*-Inkubator der Firma Infors HT (Bottmingen/Schweiz).

3.4 Materialien und Geräte für immunologische Nachweisverfahren

Für die immunologischen Nachweisverfahren wurden folgende Antikörper verwendet: *Monoclonal anti-c-Myc Purified Mouse Immunoglobulin* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), *StrepMAB-Classical – Anti Strep tag II[®] monoclonal IgG1 antibody* (IBA BioTAGnology, Göttingen), *HRP anti-M13 monoclonal Conjugate* (GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH, Freiburg), *anti-Mouse IgG HRP Conjugate (polyclonal)* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), *anti-Mouse IgG AP Conjugate (WesternBreeze[®] Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* von Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA). Als Trägermaterial für ELISA-Experimente wurden *high-binding*-Greiner-ELISA-96-well-Platten der Firma Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen) verwendet. Als Substrat zur Visualisierung der ELISA-Experimente diente *TMB one (ready-to-use) substrate* (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln). Die Visualisierung erfolgte an einer *SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Detection Platform* der Firma Molecular Devices, LLC (Sunnyvale/USA).

Für *Western Blot*-Analysen wurde das *Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell System* (Bio-Rad, München) mit der Spannungsquelle *PowerPac[™] Basic Power Supply* (Bio-Rad, München) verwendet. Als Membranen wurden Nitrocellulosemembranen verwendet. Als Substrat kam entweder das *Lumigen PS-3 Acridan* (Amersham *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*, GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH, Freiburg) oder eine Kombination aus *BCIP/NBT* (*WesternBreeze[®] Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit*) zum Einsatz. Die Visualisierung erfolgte entweder *HRP*-gekoppelt durch den Lumineszenz-Entwickler *Image Quant LAS 4000 mini* (GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH, Freiburg) unter Verwendung der entsprechenden Software oder *AP*-gekoppelt unter Verwendung des *WesternBreeze[®] Chromogenic Western Blot Immunodetection Kits* von Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA).

3.5 Materialien und Geräte für die Reinigung rekombinanter Proteine

Für die Reinigung rekombinanter Proteine wurden folgende Säulenmaterialien und Geräte verwendet: Kationenaustauschchromatographien erfolgten unter Verwendung des *Toyopearl-650M*-Säulenmaterials von Supelco (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), Anionenaustauschchromatographien unter Durchführung einer Perfusionschromatographie mit einer *BioCAD[®] 700* (PerSeptive BioSystems, Framingham/USA) und einem starken Anionentauscher *POROS 20 HQ* (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA), Größenausschlusschromatographien unter Verwendung eines *AEKTA Prime Plus Systems* der Firma GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH (Freiburg) in Kombination mit einer entsprechenden Säule (*HiLoad[™] 16/60 Superdex[™] 75 prep grade*), Affinitätschromatographien erfolgten unter Verwendung einer *Strep-Trap[™] HP*-Säule (GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH, Freiburg). Zur Aufkonzentration von Proteinlösungen wurden die *Centriprep-10K*-Aufkonzentratoren der Firma Millipore (Merck Chemicals GmbH, Schwalbach) verwendet.

3.6 Anzuchtmedien, Antibiotika und Puffer

3.6.1 Anzuchtmedien

Für die Kultivierung von *E. coli*- bzw. *S. cerevisiae*-Kulturen wurden die hier aufgeführten Medien verwendet:

Luria-Bertani-Medium (LB): 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton

2YT-Medium: 16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

SOC-Medium: 20g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄,
20 mM Glukose

YPD-Medium: 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 12 g/l Glukose

SC-Medium: 6,6 g/l Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren, 1,3 g/l Uracil-/Leucin-Defizienzmedium (0,37 g Adenin, 1 g Histidin-HCl, 1 g Arginin-HCl, 1 g Methionin, 1,5 g Tyrosin, 1,5 g Isoleucin, 1,5 g Lysin-HCl, 2,5 g Phenylalanin, 5 g Asparaginsäure, 7,5 g Valin, 10 g Threonin, 18,75 g Serin), 80 g/l Glukose

SC Ura⁻: 36 mg/l Leucin

SC Leu⁻: 24 mg/l Uracil

3.6.2 Antibiotika

Die folgenden Antibiotika wurden in den aufgeführten Konzentrationen eingesetzt:

Kanamycin: 10 mg/l für Standardapplikationen bzw. 50 mg/l für Helferphagenselektionen

Chloramphenicol: 34 mg/l

Tetracyclin: 12,5 mg/l

Ampicillin: 100 mg/l

3.6.3 Puffer

Bei den in Tabelle 3.2 aufgeführten Puffern handelt es sich um verwendete Standardpuffer, die unter den jeweiligen Abschnitten nur namentlich erwähnt, in der Zusammensetzung jedoch nicht gesondert aufgeführt werden. Spezielle Puffer werden gegebenenfalls in den jeweiligen Abschnitten gesondert aufgeführt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung verwendeter Standardpuffer.

Name	Zusammensetzung	pH
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,0 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄	7,4
PBST (<i>phosphate buffered saline containing Tween[®]20</i>)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,0 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 0,1 % (v/v) <i>Tween[®]20</i>	7,4
TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	50 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl	7,5
TBST (<i>Tris buffered saline containing Tween[®]20</i>)	50 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 0,1 % (v/v) <i>Tween[®]20</i>	7,5
TAE-Puffer für die DNA-Gelelektrophorese	20 mM Essigsäure, 40 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA	8,0
Transferpuffer für <i>Western Blot</i> -Analysen	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol	8,3

3.7 Bakterien- und Hefestämme

Folgende *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Stämme kamen zum Einsatz:

Tabelle 3.3: Verwendete *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Stämme mit deren Genotyp.

Stamm	Genotyp
<i>E. coli Dh5α</i>	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
<i>E. coli XLI blue</i>	<i>endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac [F⁺ proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
<i>E. coli TG1</i>	<i>Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK- mK-) thi-1 supE [F⁺ traD36 proAB lacIqZΔM15]</i>
<i>S. cerevisiae DLM 101α</i>	<i>α[Mat a, leu 2-3,-112 his 2, 3-11,-15 can 1, ura 3Δ, pep4 Δ, [cir⁰], DM 23]</i>

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden entweder der Stammsammlung entnommen oder – wie im Falle von elektrokompetenten *E. coli XLI blue*-Zellen – von der Firma Agilent Technologies Inc. (Böblingen) kommerziell erworben.

Die Zelllinie *DLM 101 α* wurde von Prof. Dr. L. Hedstrom, Brandeis University Waltham/USA zur Verfügung gestellt.

3.8 Plasmide und Vektorkonstrukte

Für die Expression der Trypsiligasevarianten sowohl als zymogene Vorstufen als auch als aktive Enzymformen in *S. cerevisiae* wurde der Hefeexpressionsvektor pYT verwendet. Als *E. coli* Shuttle-Vektoren für die Klonierung der Trypsiligasevarianten wurden sowohl der pST- als auch ein pET28a-Vektor verwendet. Ein mpET28a-Vektor⁵, der die Trypsiligase als zymogene Vorstufe enthielt, wurde von Dipl.-Biochem. Lars Franke (MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Ein mpET28a-Vektor, welcher die Trypsiligase als aktive Enzymvariante enthielt, wurde von Dr. Sandra Liebscher (MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Der *wt*-pYT- und *wt*-pST-Vektor wurde von Prof. Dr. L. Hedstrom, Brandeis University Waltham/USA zur Verfügung gestellt. Der hier verwendete pST-Ausgangsvektor enthielt bereits die Sequenz für die Trypsiligase als zymogene Vorstufe und wurde ebenfalls von Dr. Sandra Liebscher bereitgestellt.

Der pYT-Hefeexpressionsvektor und die *E. coli* Shuttle-Vektoren pST bzw. mpET28a enthalten einen ADH/GAPDH-Promotor und einen α -factor-leader. Der Genabschnitt aus ADH/GAPDH Promotor, α -factor-leader und der Sequenz codierend für die Trypsiligasevarianten wird in allen aufgeführten Vektoren von BamHI/SalI-Schnittstellen flankiert, was ein Umklonieren zwischen den Vektoren ermöglicht.

⁵ mpET28a entspricht pET28a ohne His-tag (HHHHHH)

Die Vektoren pYT und pST verfügen über eine Gensequenz für die Ausbildung einer Ampicillinresistenz, die mpET28a-Vektoren für die Ausbildung einer Kanamycinresistenz der transformierten *E. coli*-Zellen als Selektionsmarker. Die pYT-Vektoren verfügen zusätzlich über einen Selektionsmarker für Uracil- und Leucin-defizientes Medium.

Der für das *Phage Display* verwendete Phagemid *wt*-pSCIL-PhD10 wurde von Scil Proteins GmbH Halle/Saale zur Verfügung gestellt. Der durch Deletion des His-tags⁶ modifizierte pSCIL wird im Folgenden mpSCIL genannt.

Der mpSCIL codiert unter der Transkriptionskontrolle des *tac*-Promotors für ein Fusionsprotein aus *pelB leader*, Trypsiligasevariante, *MyCUT*-tag⁷ und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins (AS 253–406). Die Gensequenz für die Trypsiligasevariante und die C-terminale Domäne des pIII-Proteins wird von einem Amber-Stop-Codon (TAG) unterbrochen. Aufgrund ähnlicher Epitope des *MyCUT*-tags⁷ und des c-Myc-tags⁸ wird der *MyCUT*-tag⁷ ebenfalls von anti-c-Myc-Antikörpern erkannt [152]. Die Insertion der randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten in den mpSCIL erfolgte über SfiI-Schnittstellen. Das Genprodukt des Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gens bewirkt eine Chloramphenicolresistenz in transformierten *E. coli*-Zellen.

Die im Rahmen der Arbeit generierten Vektorkonstrukte sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

⁶ His-tag: HHHHHH

⁷ *MyCUT*-tag: EQKLISEENLYFQG [152]

⁸ c-Myc-tag: EQKLISEEDL [153]

Tabelle 3.4: Im Rahmen der Arbeit generierte Vektorkonstrukte. Die Blau dargestellten Trypsiligasevarianten wurden für die Expression als zymogene Vorstufen kloniert. Die Grün dargestellten Trypsiligasevarianten wurden für die Expression als aktive Biokatalysatoren kloniert.

Konstrukt	Vektor	Schnittstelle ⁹
mpSCIL (Eliminierung His-tag ⁶ im <i>wt</i> -pSCIL)	<i>wt</i> pSCIL	BamHI
Trypsiligase	mpSCIL	SfiI, SfiI
Trypsiligase_ <i>Strep</i> -tagII ¹⁰	mpSCIL	SfiI, SfiI
Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene		
K60E/N143H/E151H/D189K/ S61Xaa ₁ /R62Xaa ₂ /Q64Xaa ₃ /S190Xaa ₄ /Q192Xaa ₅	mpSCIL	SfiI, SfiI
Trypsiligasevariante 1	pST	BamHI, Sall
K60E/N143H/E151H/D189K/S61A/R62K/Q64P/S190A/Q192H	pYT	BamHI, Sall
Trypsiligasevariante 2	mpET28a	KpnI, Sall
K60E/N143H/E151H/D189K/S61T/R62D/Q64V/S190V/Q192P	pYT	BamHI, Sall
Trypsiligasevariante 3	mpET28a	KpnI, Sall
K60E/N143H/E151H/D189K/S61H/R62G/Q64V/S190S/Q192Q	pYT	BamHI, Sall
Trypsiligasevariante 4	mpET28a	KpnI, Sall
K60E/N143H/E151H/D189K/S61S/R62S/Q64H/S190G/Q192M	pYT	BamHI, Sall
Trypsiligasevariante 5	mpET28a	KpnI, Sall
K60E/N143H/E151H/D189K/S61Q/R62Q/Q64Y/S190P/Q192W	pYT	BamHI, Sall
Fab-LRH- <i>Strep</i> -tagII ^{10, 11}	pET30a	-

Die Methoden für die Generierung der zuvor dargestellten Vektorkonstrukte werden unter Kapitel 4.1 sowie unter Kapitel 4.6.3 erläutert.

3.9 Oligodesoxyribonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide für PCR-Anwendungen wurden bei Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/USA) oder bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) kommerziell erworben. NNK¹²-Oligodesoxyribonukleotide zur Generierung der Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham/USA) kommerziell erworben und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe „Innoprofile – künstliche Bindeproteine“ unter der Leitung von Dr. Sven Pfeifer zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen verwendeter Oligodesoxyribonukleotide sind in 5′–3′-Leserichtung dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

⁹ Die Schnittstellenangabe erfolgt in 5′–3′-Leserichtung

¹⁰ *Strep*-tagII: WSHPQFEK [154]

¹¹ Das Vektorkonstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher generiert

¹² N – ATGC, K – GT

Konstrukt: mpSCIL (siehe Tabelle 3.4)

(for) AGGGATCCTAGAAAGACATCCGTGCTAGCGGC (rev) CTGGATCCGCCCTGG
AAATACAG

Konstrukt: Trypsiligase (siehe Tabelle 3.4)

(for) CGCGGCCAGCCGGCCATGGCCATCGTTGGAGGATA (rev) GCGGCCTGTTTG
GCCCCGTTGGCAGCAATTGTGTCC

Konstrukt: Trypsiligase_*Strep*-tagII¹⁰ (siehe Tabelle 3.4)

(for) CGCGGCCAGCCGGCCATGGCCATCGTTGGAGGATA (rev) GCGGCCTGTTTG
GCCCCTTTTTCAAACCTGCGGATGGC

Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene (siehe Tabelle 3.4)

Primer 1 TTAGGCCAGCCGGCCATG

Primer 2 AGAGGTCTC CTCATAGCAGTGAGCTGCAGACACC

Primer 3 AGAGGTCTCTATGAG NNKNNKATCENNKGAGACTGGGAGAGCAC

Primer 4 AGAGGTCTCGTCACC MNNGCAMNNTTCTTGCCTCCCTCTAG¹³

Primer 5 AGAGGTCTC GGTGACTCTGGTGGCCCTGTG

Primer 6 TTAGGCCTGTTTGGCCCCGTTG

Trypsiligasevariante 1 S190A (siehe Tabelle 3.4)

(for) GGCAAGAAAGCCTGCCAGGG (rev) CCCTGGCAGGCTTTCTTGCC

Trypsiligasevariante 1 Q192H

(for) GAAAGCCTGCCACGGTGACTC (rev) GAGTCACCGTGGCAGGCTTTC

Trypsiligasevariante 1 S61A

(for) CTGCTATGAGGCCCGCATCCAAG (rev) CTTGGATGCGGGCCTCATAGCAG

Trypsiligasevariante 1 R62K (1)

(for) GCTATGAGGCCCGGATCCAAGTG (rev) CACTTGGATCCGGGCCTCATAGC

Trypsiligasevariante 1 R62K (2)

(for) GCTATGAGGCCAAGATCCAAGTG (rev) CACTTGGATCTTGGCCTCATAGC

Trypsiligasevariante 1 Q64P

(for) GGCCAAGATCCCAGTGAGACTGGG (rev) CCCAGTCTCACTGGGATCTTGGCC

Trypsiligasevariante 2 (siehe Tabelle 3.4)

Primer 1 (5'KpnI_Zymogen) TTAGGTACCTTTGGATAAAAAGAGAAGC

Primer 2 AGAGGTCTC CTCATAGCAGTGAGCTGCAGACACC

Primer 3 AGAGGTCTCTATGAGACGGATATCGTTGTGAGACTGGGAGAGCAC

Primer 4 AGAGGTCTCGTCACCCGGGCACACTTCTTGCCTCCCTCTAG

Primer 5 AGAGGTCTC GGTGACTCTGGTGGCCCTGTG

Primer 6 (3'Sall) TAGTCGACCTAGTTGGCAGCAATTGTGTC

¹³ MNN revers-komplementäre Sequenz zu NNK

Trypsiligasevariante 3 (siehe Tabelle 3.4)

Primer 1 (5'KpnI_aktiv) AAGGTACCTTTGGATAAAAGAATCGTTGG

Primer 2 AGAGGTCTC CTCATAGCAGTGAGCTGCAGACACC

Primer 3 AGA GGTCTCTATGAGCATGGTATCGTTGTGAGACTGGGAGAGCAC

Primer 6 (3'Sall) TAGTCGACCTAGTTGGCAGCAATTGTGTC

Trypsiligasevariante 4 (siehe Tabelle 3.4)

Primer 1 (5'KpnI_aktiv) AAGGTACCTTTGGATAAAAGAATCGTTGG

Primer 2 AGAGGTCTC CTCATAGCAGTGAGCTGCAGACACC

Primer 3 AGAGGTCTCTATGAGTTCGAGTATCCATGTGAGACTGGGAGAGCAC

Primer 4 AGAGGTCTCGTCACCCATGCAACCTTTCTTGCCTCCCTCTAG

Primer 5 AGAGGTCTC GGTGACTCTGGTGGCCCTGTG

Primer 6 (3'Sall) TAGTCGACCTAGTTGGCAGCAATTGTGTC

Trypsiligasevariante 5 (siehe Tabelle 3.4)

Primer 1 (5'KpnI_aktiv) AAGGTACCTTTGGATAAAAGAATCGTTGG

Primer 2 AGAGGTCTC CTCATAGCAGTGAGCTGCAGACACC

Primer 3 AGAGGTCTCTATGAGCAACAAATCTATGTGAGACTGGGAGAGCAC

Primer 4 AGAGGTCTCGTCACCCCAGCACGGTTTCTTGCCTCCCTCTAG

Primer 5 AGAGGTCTC GGTGACTCTGGTGGCCCTGTG

Primer 6 (3'Sall) TAGTCGACCTAGTTGGCAGCAATTGTGTC

Konstrukt: Fab-LRH-*Strep*-tagII^{10,11} (siehe Tabelle 3.4)

(for) AACTCATACTCTTCGCCATGCGG (rev) TTATCGCAAGATTTCGGTTC

4 Methoden

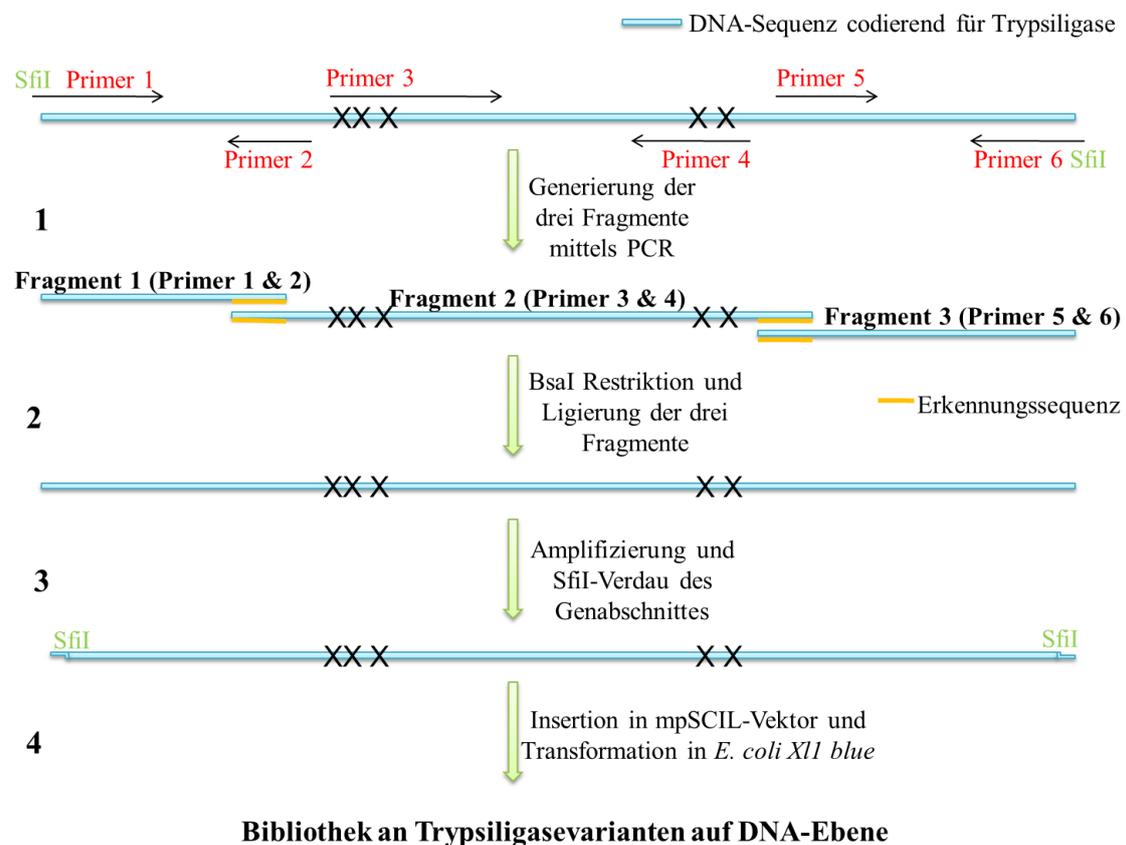
4.1 Klonierung benötigter Konstrukte für das *Phage Display*

4.1.1 Generierung von mpSCIL-Vektorkonstrukten

Die Zusammensetzungen der hier verwendeten PCR-Reaktionen zur Generierung der Konstrukte mpSCIL, Trypsiligase und Trypsiligase_*Strep*-tagII¹⁰ im mpSCIL (siehe Tabelle 3.4) erfolgten nach Herstellerangaben der verwendeten DNA-Polymerase. Die PCR-Reaktionen selbst sowie die nötigen Restriktions- und Ligationsschritte erfolgten nach Standardprotokollen (Maniatis et al. [155]). Erhaltene Vektorkonstrukte wurden an ausgewählten Konstruktionspunkten mittels Sangersequenzierung bestätigt.

4.1.2 Generierung der Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene

Eine Übersicht der angewandten Klonierungsstrategie ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die theoretische Klonierungsstrategie wurde freundlicherweise von Dr. Li Yuan zur Verfügung gestellt.



Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene

Abbildung 4.1: Klonierungsstrategie zur Generierung der Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene. Die mit X markierten Positionen symbolisieren die Randomisierungsstellen Ser61, Arg62, Gln64, Ser190 und Gln192.

Die mit X markierten Positionen symbolisieren die Randomisierungsstellen Ser61, Arg62, Gln64, Ser190 und Gln192. Die Aminosäuresequenz der Trypsilignase ist mit der genauen Angabe der Randomisierungsstellen in Abbildung 4.2 A gezeigt. Die DNA-Sequenz der Trypsilignase in 5′–3′-Leserichtung ist mit der genauen Angabe der Randomisierungsstellen in Abbildung 4.2 B gezeigt.

A

IVGGYTCQENSVPYQVSLNSGYHFCGGSLINDQWVVSAAHCYESRIQVRLGEHNINVL
EGNEQFVNAAKIIKHPNFDRKTLNNDIMLIKLSPPVKLNARVATVALPSSCAPAGTQCLI
SGWGHTLSSGVNHPDLLQCLDAPLLPQADCEASYPGKITDNMVCVGFLEGGKKSCQG
DSGGPVVCNGELQGIVSWGYGICALPDNPGVYTKVCNYVDWIQDTIAAN

B

atcgttgaggatacacctgccaagagaattctgtccctaccaagtgcctgaactctggctaccacttctgtggaggtccctcatcaa
tgaccagtgggtggtgtctgcagctcactgctatgagtccegcaccaaagtgcagactgggagagcacaacatcaatgccttgagggc
aatgagcagttgtcaatgctgccaagatcatcaagcatccaactcgataggaagaccctgaacaatgacatcatgctgatcaagctc
tctccctgtgaaactcaatgctcagtgccactgtggctcttccagctcctgtgcactgcaggcactcagtcctcatctctggctg
ggccacacgctcagcagtgccgtcaatcaccagacgtcctcagtgctggatgccccactgctgccccaaactgactgtgaagcct
cctaccctggaaagatcactgacaacatggtctgtgtggctcctagaggaggcaagaaaactgcagggtgactctggtggccctgt
ggtctgtaattggagagctgcagggcattgtctcctggggtatggctgtgccctgccagataaacctggtgtgtacccaaggtctgcaac
tatgtggactggattcaggacacaattgctgccaac

Abbildung 4.2: **A** – Aminosäuresequenz der Trypsilignase. Randomisierungsstellen Ser61, Arg62, Gln64, Ser190 und Gln192 sind Blau und kursiv hervorgehoben. **B:** DNA-Sequenz der Trypsilignase in 5′–3′-Leserichtung. Randomisierungsstellen Ser61, Arg62, Gln64, Ser190 und Gln192 sind Blau und kursiv hervorgehoben.

Die randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsilignasevarianten wurden aus drei einzelnen Fragmenten unter Verwendung von BsaI-Schnittstellen zusammengesetzt. Anschließend erfolgte die Insertion in den mpSCIL-Vektor über SfiI-Schnittstellen. Die in Abbildung 4.1 gezeigten Schritte werden im Folgenden näher erläutert. In jedem dieser Schritte wurde eine Limitation der theoretischen Bibliotheksgröße von $3,4 \times 10^7$ Varianten durch die Verwendung einer ausreichenden Anzahl an DNA-Molekülen ausgeschlossen. Für die Generierung der Fragmente (Schritt 1, Abbildung 4.1) fanden die unter Kapitel 3.9 aufgeführten Oligodesoxyribonukleotide Anwendung, welche unter der Überschrift „Bibliothek an Trypsilignasevarianten auf DNA-Ebene“ aufgeführt sind.

Für die Generierung der drei Fragmente wurden drei individuelle PCR-Reaktionen mit dem jeweils vorgesehenen Primerpaar durchgeführt (siehe Abbildung 4.1). Die PCR-Ansätze (50 µl) enthielten 1 × Pfu-Puffer (inklusive 2 mM MgSO₄), 0,2 µM je Primer, 0,2 mM je dNTP, 1 ng DNA (Template: Trypsilignase im mpSCIL-Vektor), 2,5 U Pfu DNA-Polymerase.

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 Minuten	30 Zyklen
Denaturierung	95 °C	1 Minute	
Anlagerung	55 °C	1 Minute	
Verlängerung	72 °C	2 Minuten	
Postverlängerung	72 °C	5 Minuten	

In einer anschließenden simultanen Restriktions- und Ligationsreaktion [156] wurden die drei Fragmente BsaI verdaut und ligiert (Schritt 2, Abbildung 4.1). Hierzu wurden je 75 ng der Fragmente 1–3 eingesetzt ($\geq 1,7 \times 10^{11}$ DNA-Moleküle). Der Reaktionsansatz enthielt außerdem 40 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 2,5 U BsaI und 20 U T4 DNA-Ligase. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler nach dem hier gezeigten Programm durchgeführt:

Restriktion	37 °C	2 Minuten	50 Zyklen
Ligation	16 °C	5 Minuten	
Finale Restriktion	37 °C	5 Minuten	
Inaktivierung	65 °C	20 Minuten	

Nach beendeter Reaktion wurden die enthaltenen Komponenten unter Verwendung eines 1,5%igen (w/v) Agarosegels nach Molekulargewicht getrennt. Die erhaltenen randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten wurden entsprechend selektiert, gereinigt und einer Amplifizierungsreaktion unter Verwendung von Primer 1 und 6 unterzogen (Punkt 3, Abbildung 4.1). Für die Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl an DNA-Molekülen zur Insertion in den mpSCIL-Vektor wurden 8 Amplifizierungsansätze durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 1× Pfu-Puffer (inklusive 2 mM MgSO₄), 0,2 µM je Primer, 0,2 mM je dNTP, 8,5 ng DNA ($\sim 1,2 \times 10^{10}$ DNA-Moleküle), 2,5 U Pfu DNA-Polymerase.

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 Minuten	25 Zyklen
Denaturierung	95 °C	1 Minute	
Anlagerung	55 °C	1 Minute	
Verlängerung	72 °C	2 Minuten	
Postverlängerung	72 °C	5 Minuten	

Die amplifizierten und randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten wurden erneut anhand des Molekulargewichts unter Verwendung eines 0,8%igen (w/v) Agarosegels selektiert und gereinigt, wobei 10,4 µg der DNA-Sequenzen isoliert wurden. Der SfiI-Verdau der randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten erfolgte unter Standardbedingungen des Restriktionsenzym. Die Inkubationszeit bei 50 °C betrug 16 Stunden. Nach erneuter Reinigung der randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsili-

gasevarianten über eine Säule (*PCR Clean-up*) wurden ca. 1 µg SfiI-verdaute DNA-Sequenzen erhalten. Für die Ligation der SfiI-verdauten DNA-Sequenzen in den mpSCIL (Schritt 4, Abbildung 4.1) wurde ein geeignetes molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1:2 ermittelt. Die Ermittlung des geeigneten Vektor/Insert-Verhältnisses erfolgte anhand von Probeligationen im 50-ng-Maßstab. Der mpSCIL wurde dazu ebenfalls unter Standardbedingungen des Restriktionsenzym (SfiI) verdaut. Die Inkubationszeit bei 50 °C betrug 17 Stunden. Der Restriktionsansatz wurde anschließend unter Verwendung eines 0,8%igen (w/v) Agarosegels nach Molekulargewicht getrennt. Das entsprechende SfiI-verdaute mpSCIL-Fragment wurde aus dem Agarosegel gereinigt, wobei 3,7 µg des mpSCIL-Fragmentes erhalten wurden. Die Ligationreaktion zur Generierung der Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf Vektorebene (Schritt 4, Abbildung 4.1) enthielt 200 ng Vektor-DNA ($\sim 6,3 \times 10^{-14}$ mol), 53,6 ng Insert-DNA ($\sim 1,3 \times 10^{-13}$ mol), 1 × T4 Ligase-Puffer und 5 U T4 DNA-Ligase. Insgesamt wurden 10 Ligationsansätze mit einer Gesamtvektormenge von 2 µg und einer Insertmenge von 536 ng verwendet. Nach einer Inkubation für 3 Stunden bei 23 °C wurde die Reaktion durch thermische Inaktivierung der Ligase beendet und das Ligationsprodukt über eine Säule gereinigt (*PCR Clean-up*). Zur Komplettierung der Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene wurde ungefähr 1 µg des Ligationsproduktes ($\sim 1,7 \times 10^{11}$ DNA-Moleküle) in 500 µl kommerziell erworbene *E. coli XLI blue*¹⁴-Zellen mittels Elektroporation transformiert. Dazu wurden 10 50-µl-Aliquote der *E. coli XLI blue*-Zellen mit je ca. 100 ng Ligationsprodukt inkubiert. Die anschließende Elektroporation erfolgte nach Herstellerangaben der Zellen unter Verwendung von SOC-Medium. Die Selektion auf positive Transformationsereignisse erfolgte auf entsprechenden Selektionsplatten mit einem Durchmesser von 13,5 cm bei 37 °C für 18 Stunden. Erfolgreich transformierte Zellen wurden in 2YT-Medium aufgenommen und vereinigt. Die Zellsuspension wurde mit 8 % (v/v) Glycerin versetzt, aliquotiert und bei –80 °C gelagert. Die Bibliotheksgröße wurde durch Anfertigen einer Verdünnungsreihe und Auszählen der erfolgreich transformierten *E. coli*-Zellen ermittelt.

4.2 Methoden zur Phagenamplifizierung, -titration und -anreicherung

Die folgenden Methoden sind von Standardprotokollen abgeleitet (Clackson & Lowmann [130]) und wurden entsprechend der Anwendung modifiziert.

¹⁴ Transformationseffizienz $\geq 1 \times 10^{10}$ cfu/µg bezogen auf pUC18 DNA

4.2.1 Amplifizierung verwendeter Phagen

4.2.1.1 Amplifizierung von M13KO7-Helferphagen

Eine 5-ml-Kultur aus *E. coli XLI blue*-Zellen wurde bei 37 °C, 150 rpm unter Verwendung von 2YT-Medium inkubiert. Das 2YT-Medium wurde mit Tetracyclin versetzt und die Inkubation erfolgte bis zu einer OD_{600 nm} von ungefähr 0,5. Die Infektion der *E. coli XLI blue*-Zellen mit kommerziell erhältlichen M13KO7-Helferphagen erfolgte bei 30 °C, 150 rpm für 1 Stunde. Die Amplifizierung und Sekretion der Helferphagen erfolgte durch Zugabe von 100 ml – mit Kanamycin versetztem – 2YT-Medium und Inkubation für weitere 18 Stunden bei 30 °C, 200 rpm. Die amplifizierten und sekretierten Helferphagen wurden aus dem Kulturüberstand durch eine PEG/NaCl-Fällung gewonnen, wobei die *E. coli XLI blue*-Zellen zunächst bei 3951 g für 20 Minuten bei 4 °C sedimentiert wurden. Die Eliminierung verbliebener Zellfragmente erfolgte durch Filtration des Kulturüberstandes mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm). Die Fällung der Helferphagen aus dem Kulturüberstand erfolgte durch Zugabe von 1/4 Volumen kalter PEG/NaCl¹⁵-Lösung. Vervollständigt wurde die Fällung bei 4 °C für 3 Stunden. Die präzipitierten Helferphagen wurden bei 11400 g für 30 Minuten bei 4 °C sedimentiert und in 1/50 Volumen TBS gelöst. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C unter Zugabe von 20 % (v/v) Glycerin.

4.2.1.2 Generierung einer Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf Proteinebene

Für die Generierung der Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf Proteinebene wurden ungefähr 1×10^8 – den Phagemid tragende – *E. coli XLI blue*-Zellen aus dem Glycerinstock der Bibliothek auf DNA-Ebene (Kapitel 4.1.2) verwendet. Die Zellen wurden in 100 ml 2YT-Medium überführt, das mit Chloramphenicol und Tetracyclin versetzt wurde. Durch die Verwendung von ungefähr 1×10^8 *E. coli XLI blue*-Zellen wurde die Diversität der Trypsiligasebibliothek ($3,4 \times 10^7$ Varianten) gewahrt. Das Wachstum der *E. coli XLI blue*-Zellen erfolgte bei 37 °C und 150 rpm, bis eine OD_{600 nm} von ungefähr 0,5 erreicht wurde. Die Infektion der *E. coli XLI blue*-Zellen mit M13KO7-Helferphagen erfolgte unter Verwendung einer MOI¹⁶ von 5 [157] für 1 Stunde bei 30 °C, 150 rpm. Zelluläre Bestandteile wurden bei 4 °C und 2744 g für 10 Minuten sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Biofeuchtmasse wurde in 100 ml 2YT-Medium aufgenommen, welches mit Chloramphenicol, Tetracyclin und Kanamycin versetzt wurde. Die Amplifizierung und Sekretion der rekombinanten Phagen erfolgte durch Inkubation der Kultur bei 30 °C, 200 rpm für ungefähr 18 Stunden. Die Fällung und Lagerung der rekombinanten Phagen erfolgte wie für die M13KO7-Helferphagen bereits be-

¹⁵ PEG/NaCl: 20 % (w/v) PEG₈₀₀₀, 2,5 M NaCl

¹⁶ MOI = *Multiplicity of Infection*

schrieben (Kapitel 4.2.1.1). Eine modifizierte Amplifizierung rekombinanter Phagen erfolgte unter Verwendung von D-Glukose im Kulturmedium zur Unterdrückung der Basalexpression des Phagemids bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion. Die Amplifizierung, Sekretion, Fällung und Lagerung erfolgte wie hier bereits beschrieben. Jedoch wurden der 100-ml-Kultur zu Beginn 20 mM D-Glukose zugegeben. Im Anschluss an den beschriebenen Sedi-mentationsschritt erfolgte die Resuspendierung der Biofeuchtmasse in glukosefreiem Medi-um, um die Basalexpression des Phagemids nicht weiter zu unterdrücken.

4.2.1.3 Amplifizierung weiterer rekombinanter Phagen

Die Amplifizierung von rekombinanten Phagen, welche die Trypsiligase bzw. die Trypsiliga-se mit C-terminalem *Strep*-tagII¹⁰ präsentierten, erfolgte wie unter Kapitel 4.2.1.2 beschrie-ben. Jedoch wurde der Phagemid mittels Hitzeschock in ausgewählte *E. coli*-Zellen transfor-miert. Als Ausgangsmaterial für die 100-ml-Kultur diente eine Einzelkolonie der entspre-chenden Selektionsplatte.

4.2.2 Titration von Phagenlösungen

Sämtliche Titrations wurden unter Verwendung von *E. coli XII blue*-Zellen durchgeführt, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Für die Bestimmung der Pha-genkonzentration einer Lösung wurde von der betreffenden Phagenlösung eine Verdünnungs-reihe in 2YT-Medium angefertigt. 100 µl einer geeigneten Verdünnungsstufe (ca. 10³ Pha-gen/ml) wurden zu 100 µl einer Kultur aus *E. coli XII blue*-Zellen geeigneter Zellzahl gege-ben (ca. 10⁸–10⁹ Zellen/ml). Nach erfolgter Infektion der Zellen für 30 Minuten bei 37 °C wurden 100 µl der Kultur auf eine entsprechende Selektionsplatte gegeben und für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Phagenkonzentration der titrierten Lösung wurde anhand der Koloniezahl auf der Selektionsplatte unter Einbeziehung der Verdünnungsstufe berechnet. Zur Erfassung aller vorhandenen Phagen in einer Phagenlösung wurde diese mit ~500 µl einer Kultur aus *E. coli XII blue*-Zellen geeigneter Zellzahl (ca. 10⁸–10⁹ Zellen/ml) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der komplette Ansatz wurde auf eine entsprechende Selektionsplatte ge-geben und für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Koloniezahl der Selektionsplatte spiegelte die vor der Titration in der Phagenlösung befindlichen unterschiedlichen Phagen wider.

4.2.3 Selektive Anreicherung funktionaler rekombinanter Phagen

Die aus der Trypsiligasebibliothek amplifizierten rekombinanten Phagen enthalten C-terminal der Trypsiligasevariante den *MyCUT*-tag⁷. Dieser kann als Funktionalitätsmarker in einem *capture*-Experiment fungieren. Durch die Interaktion des *MyCUT*-tags⁷ mit immobilisiertem anti-c-Myc-Antikörper wurden rekombinante Phagen, welche einen funktionalen *MyCUT*-tag⁷

und somit auch eine funktionale Trypsiligasevariante aufwiesen, an den immobilisierten Antikörper gebunden. Unfunktionale rekombinante Phagen wurden durch Waschschriffe eliminiert. Die Ablösung der funktionalen rekombinanten Phagen vom anti-c-Myc-Antikörper wurde anschließend durch eine Aufhebung der Antigen-Antikörper-Bindung realisiert.

Als *capture*-Antikörper wurden 0,6 µg anti-c-Myc-Antikörper in einer Kavität einer 96-well-high-binding-ELISA-Platte immobilisiert. Der Antikörper wurde in PBS verdünnt und bei 4 °C für 18 Stunden immobilisiert. In einer weiteren Kavität wurde als Negativkontrolle mit reinem PBS gearbeitet. Die weiteren Schritte erfolgten simultan in beiden Kavitäten. Nach erfolgter Immobilisierung wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl PBST entfernt. Die Sättigung unspezifischer Bindestellen der Polystyroloberfläche erfolgte für 1 Stunde bei 23 °C durch Zugabe von 300 µl Blockierungspuffer (10 x *Blocking Buffer* Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 200 µl PBS erfolgte die Inkubation der Kavitäten mit rekombinanten Phagen. Es wurden pro Kavität 1×10^8 rekombinante Phagen in PBS für 1 Stunde bei 23 °C inkubiert. Unspezifische Bindungspartner wurden durch zehnmaliges Waschen mit je 200 µl PBST entfernt. Zur Entfernung des Detergens Tween[®]20 wurden die Kavitäten im Anschluss dreimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Die Elution der spezifisch an den anti-c-Myc-Antikörper gebundenen rekombinanten Phagen erfolgte mittels pH-Absenkung von pH 7,4 auf pH 2,6 unter Verwendung von 100 µl eines 0,1 M Glycin/HCl Puffers (pH 2,6) für 15 Minuten bei 23 °C. Die Phagenlösung wurde im Anschluss durch Zugabe von 20 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 neutralisiert.

4.3 Vorversuche für das geplante *Phage Display*-Projekt

4.3.1 Streulichtexperimente

Die Streulichtexperimente dienten der Untersuchung des Einflusses zweiwertiger Metallionen wie Zn^{2+} und Ca^{2+} auf die Fibrillenbildung filamentöser Phagen. Die Studien wurden bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 375 nm durchgeführt [158]. Eingesetzt wurden rekombinante Phagen, welche die Trypsiligase auf ihrer Oberfläche präsentierten und nach Kapitel 4.2.1.3 amplifiziert wurden. Um zusätzlich den Einfluss der NaCl-Konzentration im verwendeten Puffer auf die Fibrillenbildung zu untersuchen, wurde 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 50 mM und 250 mM NaCl getestet. Zunächst wurde der Anstieg der Streulichtintensität I pro mM $CaCl_2$ bei 250 mM NaCl und 50 mM NaCl betrachtet. Die Reaktionsansätze enthielten 2×10^6 rekombinante Phagen, 250 mM bzw. 50 mM NaCl, 0–150 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Insgesamt wurden folgende $CaCl_2$ -Konzentrationen verwendet: 0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 90 mM, 150 mM. Weiterführende

Streulichtexperimente wurden bei steigender ZnCl_2 -Konzentration, konstanter CaCl_2 - und NaCl -Konzentration durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 2×10^6 rekombinante Phagen, 250 mM NaCl , 5 mM CaCl_2 , 0–100 μM ZnCl_2 , 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Verwendet wurden folgende ZnCl_2 -Konzentrationen: 0 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM .

4.3.2 Eignung der verwendeten Peptide und Pufferbedingungen für die Selektion

Untersucht wurde eine Transamidierungsreaktion. Der Reaktionsansatz enthielt dabei 500 μM $\text{Bio(PEG)}_2\text{-GAAYRHAAG}$ (Acyldonor), 1 mM RHAADapAbz (Acylakzeptor), 5 mM CaCl_2 , 25 μM ZnCl_2 und 5 μM Trypsiligase in TBS. Inkubiert wurde der Reaktionsansatz bei 30 °C und 500 rpm. Es wurden zu ausgewählten Zeitpunkten 20- μl -Aliquote entnommen und die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl 50%iger (v/v) Essigsäure beendet. Die Auftrennung der Reaktionsansätze in den einzelnen Aliquoten erfolgte mittels HPLC. Die Reaktionsausbeute konnte durch Korrelation der integrierten Produkt- und Eduktpeakflächen bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt werden. Die Identität des resultierenden Transamidierungsproduktes $\text{Bio(PEG)}_2\text{-GAAYRHAADapAbz}$ wurde massenspektrometrisch bestätigt.

4.3.3 Zugänglichkeit des immobilisierten Acyldonors

Untersucht wurde die Hydrolyse des immobilisierten Substrates $\text{Bio(PEG)}_2\text{-GAAYRHAAG}$ katalysiert durch Trypsiligase. 5 nmol des Peptides wurden unter Verwendung von 50 μl Streptavidin-*beads* (Bindekapazität: 0,9 nmol) durch Inkubation für 30 Minuten bei 23 °C immobilisiert. Überschüssiges Peptid wurde durch zehnmaliges Waschen mit je 100 μl TBS entfernt. Die gewaschenen *beads* wurden in 100 μl TBS mit 25 μM ZnCl_2 und 5 mM CaCl_2 aufgenommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Trypsiligase gestartet (Trypsiligasekonzentration im Reaktionsansatz: 5 μM). Die Hydrolysereaktion erfolgte für 45 Minuten bei 30 °C und 500 rpm. Die *beads* wurden pelletiert und der Überstand wurde mit 50 μl 50%iger (v/v) Essigsäure versetzt. Die Analyse der Hydrolysereaktion erfolgte massenspektrometrisch durch Detektion des Spaltproduktes RHAAG.

4.3.4 Funktionalität rekombinanter Phagen

Untersucht wurde die Hydrolyse des Peptidsubstrates Bz-AAAYRHAG . Als Biokatalysatoren wurden rekombinanten Phagen eingesetzt, welche die Trypsiligase auf ihrer Oberfläche präsentierten. Der Reaktionsansatz enthielt 1 mM Bz-AAAYRHAG , 5 mM CaCl_2 , 25 μM ZnCl_2 , 1×10^8 rekombinante Phagen in 100 μl TBS. Die Inkubation, Aliquotentnahme und Reaktionsanalyse erfolgte wie unter Kapitel 4.3.2 beschrieben. Die Auftrennung der Reaktionsansätze in den einzelnen Aliquoten erfolgte hier jedoch mittels UPLC. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm.

4.4 Selektion von Trypsiligasevarianten

4.4.1 Selektionsverfahren mit Streptavidin-coated-96-well-Platten als Trägermaterial

Für die Immobilisierung des Acyldonors Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG wurden 400 pmol des Substrates in eine Kavität der 96-well-Platte gegeben (Bindekapazität: max. 300 pmol). Überschüssiges Substrat wurde durch dreimaliges Waschen mit je 300 µl TBST und TBS entfernt. Die Sättigung unspezifischer Bindestellen der Polystyroloberfläche erfolgte durch Zugabe von 300 µl Blockierungspuffer (*10 x Blocking Buffer* Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) bei 23 °C für 1 Stunde. Die Kavität wurde dreimal mit je 300 µl TBS gewaschen. Zur Ausbildung kovalenter Acyl-Enzym-Intermediate wurden $1,9 \times 10^8$ rekombinante Phage¹⁷ in 100 µl TBS mit 5 mM CaCl₂ und 25 µM ZnCl₂ für 30 Minuten bei 30 °C in der vorbereiteten Kavität inkubiert. Inaktive Biokatalysatoren (d. h. nicht immobilisierte rekombinante Phagen), unspezifische Bindungspartner und Trypsiligasevarianten mit einer hohen Peptidhydrolyseaktivität wurden durch Waschen der Kavität entfernt. Dazu wurde zunächst zwanzigmal mit je 300 µl TBS gewaschen. Nachfolgend wurde die Kavität mit 300 µl TBS für 1 Stunde bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurde wiederum zwanzigmal mit je 300 µl TBS gewaschen. Die Elution der so selektierten rekombinanten Phagen der ersten Runde des Selektionsverfahrens erfolgte durch Zugabe von 400 pmol Nukleophil (RHAADapAbz) wiederum in 100 µl TBS mit 5 mM CaCl₂ und 25 µM ZnCl₂ für 15 Minuten bei 30 °C. Der Überstand nach Elution mit dem Nukleophil wurde titriert (siehe Kapitel 4.2.2). Die Klone der Selektionsplatte wurden vereinigt und in eine neue Kultur zur Amplifizierung rekombinanter Phagen (Kapitel 4.2.1.2, ohne Glukose-Zugabe) überführt. 4×10^9 rekombinante Phagen wurden für die zweite Runde des Selektionsverfahrens eingesetzt, wobei die zweite Runde analog zur ersten Runde erfolgte. Jedoch wurde ein zusätzlicher Inkubations- und Waschschriff eingeführt. Nachdem die Kavität mit TBS inkubiert und im Anschluss zwanzigmal mit TBS gewaschen wurde, wiederholten sich die beiden Schritte. Mit dem Überstand nach Elution wurde ebenfalls wie oben beschrieben verfahren. Die dritte Runde des Selektionsverfahrens wurde wiederum analog zur zweiten Runde durchgeführt und es wurden $1,8 \times 10^8$ rekombinante Phagen eingesetzt. An das zweimalige Inkubieren der Kavität mit TBS und anschließendem Waschen schloss sich ein Elutionsschriff mit Glycylglycin an. Dazu wurden 400 pmol Glycylglycin in die Kavität gegeben und für 15 Minuten bei 23 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde erneut zwanzigmal mit je 300 µl TBS gewaschen. Als letzter Waschschriff wurde einmal mit 100 µl TBS gewaschen. Die abschließende spezifische Elution mit dem Nukleophil RHAADapAbz er-

¹⁷ Amplifiziert wie in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben ohne Unterdrückung der Basalexpression.

folgte wie bereits beschrieben. Der letzte Waschschrift sowie der finale Elutionsschrift wurden – wie unter Kapitel 4.2.2 beschrieben – titriert.

4.4.2 Selektionsverfahren mit Streptavidin-*beads* als Trägermaterial

Zur Ausbildung kovalenter Acyl-Enzym-Intermediate wurden 7×10^7 rekombinante Phagen¹⁷, 25 μM ZnCl_2 , 5 mM CaCl_2 und 100 nM des Substrates Bio(PEG)₂.GAAYRHAAG in 100 μl TBS für 15 Minuten bei 23 °C inkubiert. Die Immobilisierung aller biotinhaltiger Moleküle wurde durch Zugabe von Streptavidin-*beads* im molaren Verhältnis von 10:1 und Inkubation für 15 Minuten bei 23 °C realisiert. In diesem Schritt wurden stabile kovalente Acyl-Enzym-Intermediate ebenfalls über den Biotinanker immobilisiert. Inaktive Biokatalysatoren (d. h. nicht immobilisierte rekombinante Phagen), unspezifische Bindungspartner und Trypsinligasevarianten mit einer hohen Peptidhydrolyseaktivität wurden durch Waschschrift entfernt. Dazu wurde zunächst fünfzehnmal mit je 100 μl TBS gewaschen. Abschließend wurde als letzter Waschschrift mit 100 μl TBS für 15 Minuten bei 23 °C inkubiert. Die Überstände – mit Ausnahme des letzten Waschschriftes – wurden verworfen. Die gewaschenen Streptavidin-*beads* wurden in 100 μl TBS mit 25 μM ZnCl_2 , 5 mM CaCl_2 und 200 nM Nukleophil RHAADapAbz aufgenommen und für 15 Minuten bei 23 °C inkubiert. In diesem Schritt erfolgte eine Elution der rekombinanten Phagen, die über das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat der Trypsinligasevarianten an die Streptavidin-*beads* immobilisiert waren. Die so erhaltene Phagenlösung nach Elution wurde wie unter Kapitel 4.2.2 beschrieben titriert. Für die Verifizierung einer selektiven Elution der rekombinanten Phagen wurde der letzte Waschschrift ebenfalls titriert. Als Erweiterung dieser Selektionsmethode wurden $\sim 2,8 \times 10^3$ auf Funktionalität selektierte (Kapitel 4.2.3) rekombinante Phagen eingesetzt, bei deren Amplifizierung die Basalexpression bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion unterdrückt wurde (Kapitel 4.2.1.2).

4.5 Immunologische Nachweisverfahren

4.5.1 Western Blot-Analysen

Als Membranen für die *Western Blot*-Analysen wurden ausschließlich Nitrocellulosemembranen verwendet. Der Proteintransfer erfolgte für 1 Stunde bei konstanten 350 mA. Die Durchführung der Analysen erfolgte laut Herstellerangaben des *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* der Firma GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH (Freiburg). Als Puffersystem diente ausschließlich PBS bzw. PBST. Als primäre Antikörper wurden 4 μg anti-c-Myc-Antikörper bzw. 2 μg *StrepMAB-Classic*-Antikörper verwendet. Die verwendeten sekundären Antikörper *anti-mouse HRP Conjugate* bzw. *anti-mouse AP Conjugate* wurden laut

Herstellerangaben 1:5000 in PBST verdünnt. Die Detektion erfolgte durch Zugabe von *Lumigen PS-3 Acridan* als Substrat bei einer Wellenlänge von 430 nm oder durch Zugabe von *BCIP/NBT* im VIS-Bereich.

4.5.2 ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

Die Immobilisierung von 0,25 µg primärem Antikörper (anti-c-Myc-Antikörper) je Kavität in 100 µl PBST erfolgte bei 4 °C für 18 Stunden. Die Kavitäten wurden zur Eliminierung des überschüssigen primären Antikörpers dreimal mit je 100 µl PBST gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen der Polystyroloberfläche wurden mit Blockierungspuffer (*10 x Blocking Buffer* Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) für 1 Stunde bei 23 °C gesättigt. Gewaschen wurden die Kavitäten wiederum dreimal mit je 100 µl PBS. 50 µl einer zu analysierenden Phagenlösung wurden für 1 Stunde bei 23 °C in einer vorbereiteten Kavität inkubiert, wobei erforderliche Verdünnungen unter Verwendung von PBS erfolgten. Unspezifische Bindungspartner wurden durch zehnmaliges Waschen mit je 100 µl PBST entfernt. Der sekundäre Antikörper (*HRP*-konjugierter anti-M13-Antikörper, Antigen: pVIII-Oberflächenprotein) wurde laut Herstellerangaben 1:5000 in PBST verdünnt. Je 50 µl der verdünnten Antikörperlösung wurden in die Kavitäten gegeben. Der sekundäre Antikörper wurde für 1 Stunde bei 23 °C inkubiert. Überschüssiger sekundärer Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit je 100 µl PBST entfernt. Im Anschluss wurde dreimal mit je 100 µl PBS gewaschen, um das Detergens Tween[®]20 zu eliminieren. Für die Detektion wurden je 50 µl *TMB one* in die Kavitäten gegeben. Das Substrat *TMB one* wurde für ca. 20 Minuten bei 23 °C in den Kavitäten unter Lichtausschluss inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 0,5 M Schwefelsäure beendet. Die Auslesung der Signalstärke erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 nm.

4.6 Molekularbiologische Arbeiten

Soweit nicht anders erwähnt oder extra aufgeführt, erfolgten die molekularbiologischen Arbeiten nach Standardprotokollen (Maniatis et al. [155]).

DNA-Isolierungen und -Reinigungen erfolgten unter Verwendung der in Kapitel 3.1 genannten *Kits*. Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben. Alle generierten Vektor-konstrukte wurden an entsprechender Stelle durch Sangersequenzierungen bestätigt, welche von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder von LGC Genomics GmbH (Berlin) durchgeführt wurden.

4.6.1 Überexpressionstests

E. coli-Zellen einer entsprechenden Selektionsplatte wurden in Flüssigkultur (2YT-Medium mit Selektionsmarker) bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Inkubation der Flüssigkultur erfolgte dabei bis zu einer OD_{600 nm} von ungefähr 0,5. Eine Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurde der Flüssigkultur ein Aliquot entnommen. Die *E. coli*-Zellen der entnommenen Aliquote wurden pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Die *E. coli*-Zellen wurden hinsichtlich eines Überexpressionsereignisses analysiert. Diese Analyse erfolgte mittels *Western Blot* (Kapitel 4.5.1).

4.6.2 Erstellung von Wachstumskurven

Die Wachstumskurven von *E. coli Xll blue*-Zellen mit entsprechendem Phagemid wurden in 2YT-Medium mit Selektionsmarker aufgenommen. Sollte die basale Expression des Phagemids unterdrückt werden, wurden dem Medium 20 mM D-Glukose zugesetzt. Als Zellmaterial diente jeweils eine Einzelkolonie der Selektionsplatte. Das Wachstum des Zellmaterials erfolgte bei 37 °C (30 °C) und 150 rpm im Inkubator. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen.

4.6.3 Klonierung ausgewählter rekombinanter Proteine

Verwendete Plasmide für die Klonierung der Trypsiligasevarianten 1–5 wurden bereits unter Kapitel 3.8 aufgeführt. Die Trypsiligasevariante 1 wurde unter Standardbedingungen [155] für eine Expression als zymogene Vorstufe kloniert. Verwendete Oligodesoxyribonukleotide sind unter Kapitel 3.9 aufgeführt. Die Trypsiligasevarianten 2–5 wurden durch die bereits beschriebene Methode der Fragmentkondensation kloniert (Kapitel 4.1.2), wobei Trypsiligasevariante 2 für eine Expression als zymogene Vorstufe generiert wurde. Die KEX-Schnittstelle befindet sich hier am 5'-Ende der Propeptidsequenz. Die Trypsiligasevarianten 3–5 wurden für eine Expression als aktive Biokatalysatoren kloniert, wobei sich die KEX-Schnittstelle direkt am 5'-Ende der Sequenz codierend für die Trypsiligasevarianten befindet. Verwendete Oligodesoxyribonukleotide sind ebenfalls unter Kapitel 3.9 aufgeführt. Da die Trypsiligasevariante 3 an den Positionen S190 und Q192 keine Mutationen auf Aminosäureebene aufwies, wurde das Fragment 2 unter Verwendung des Primerpaares 3 und 6 generiert (Kapitel 3.9).

Die Klonierungsarbeiten für das anti-TNF α Fab-Fragment wurden freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher durchgeführt. Die schwere Kette des verwendeten Fab-Fragmentes wurde C-terminal um eine LRH-Erkennungssequenz und einen *Strep*-tagII¹⁰ erweitert (Fab-LRH-

Strep-tagII¹⁰). Die Aminosäuresequenz des verwendeten Fab-Fragmentes ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

A Leichte Kette

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASFLYSGVPY
RFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

B Schwere Kette

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYIGEPY
ADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYAMDYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTLRHAAGWSHPQFEK

Abbildung 4.3: Aminosäuresequenz des anti-TNF α Fab-Fragmentes. **A:** Leichte Kette. **B:** Schwere Kette mit der C-terminalen Erkennungssequenz LRH für die Trypsiligasevariante 4 (Rot) und einem *Strep*-tagII¹⁰ (Blau, kursiv).

Verwendet wurde dazu ein pET30a-Vektor, der bereits die korrespondierende Gensequenz mit einer YRH-Erkennungssequenz enthielt. Die Mutagenese erfolgte unter Standardbedingungen [155] und Verwendung bereits genannter Primer (Kapitel 3.9). Erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Sangersequenzierung bestätigt.

4.7 Proteinchemische Methoden

4.7.1 Proteinanalytik

Die Analyse von Proteinen erfolgte in 17,5%igen (w/v) bzw. 15,5%igen (w/v) Polyacrylamidgelen unter Verwendung des Vertikalelektrophoresesystems nach Laemmli [159]. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit einer *Coomassie*-Brillant-Blau-Färbemethode [160] im VIS-Bereich. Proteinkonzentrationen wurden spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm und bekanntem Extinktionskoeffizienten bestimmt [161]. Massenspektrometrische und HPLC- bzw. UPLC-basierte Analysen erfolgten an den unter Kapitel 3.3 aufgeführten Geräten.

4.7.2 Expression und Reinigung ausgewählter rekombinanter Proteine

Ausgewählte Trypsiligasevarianten wurden für weitere Charakterisierungsstudien unter Verwendung von *S. cerevisiae* exprimiert, wobei die Biokatalysatoren in den Kulturüberstand sekretiert wurden. Anschließend wurden die Biokatalysatoren ggf. aktiviert und anschließend gereinigt. Für die Reinigung der Trypsiligasevarianten wurden die unter Kapitel 3.5 genannten Materialien und Geräte verwendet. Für die Expression der Trypsiligasevarianten wurden die Hefezellen *DLM 101 α* mit dem entsprechenden pYT-Expressionsvektor transformiert. Für

die Transformation wurde das *EZ*-Hefetransformationskit verwendet. Die Amplifizierung und Selektion transformierter Hefezellen erfolgte für 4 Tage auf Uracil-defizienten- und für 3 Tage auf Leucin-defizienten Selektionsplatten. Einzelkolonien der Leucin-defizienten Selektionsplatten wurden in 20 ml Leucin-defiziente Flüssigkultur überführt und für 3 Tage bei 30 °C und 450 rpm inkubiert. Die Expression und Sekretion der Biokatalysatoren erfolgte für 4 Tage in YPD-Medium ebenfalls bei 30 °C und 150 rpm. Die Induktion erfolgte durch die Absenkung des Glukosegehaltes von 8 % (w/v) im Leucin-defizienten Medium auf 1,2 % (w/v) im YPD-Medium. Für die Aufarbeitung der in das Medium sekretierten Biokatalysatoren wurden die zellulären Bestandteile durch einen Sedimentationsschritt bei 5250 g entfernt. Ein erster Reinigungsschritt mittels Kationenaustauschchromatographie erforderte eine pH-Wert-Absenkung des Kulturüberstandes auf pH 4,0. Die Absenkung des pH-Wertes erfolgte durch schrittweise Zugabe von 1 M HCl. Das Säulenmaterial wurde mit Na-Acetat-Puffer (2 mM Na-Acetat, 100 mM Essigsäure, pH 4,5) equilibriert und mit dem Kulturüberstand beladen. Verunreinigungen wurden anschließend ebenfalls mit Na-Acetat-Puffer entfernt. Die Elution erfolgte mit 0,2 M Tris/HCl pH 8,0. Zymogen- bzw. aktives Enzym-enthaltende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und konzentriert. Im Falle der Expression des Biokatalysators als Zymogen (Trypsiligasevariante 1 und 2) wurden die Fraktionen auf pH 7,5 eingestellt und die zymogene Vorstufe wurde durch Zugabe von 6 µg Enterokinase aktiviert, wobei die Aktivierung mittels SDS-PAGE verfolgt wurde. Verbliebenes Zymogen, Propeptid und aktivierte Trypsiligasevariante wurden nach 4 Tagen mittels Perfusionschromatographie getrennt. Nach Expression der Trypsiligasevariante 3 als aktiver Biokatalysator erfolgte ebenfalls eine finale Reinigung des Biokatalysators mittels Perfusionschromatographie – hier jedoch ohne vorangegangene Aktivierung. Das Säulenmaterial wurde mit 50 mM MES-Puffer pH 6,5 equilibriert. Die Elution erfolgte über einen linearen NaCl-Gradienten von 0–300 mM. Trypsiligasevarianten-enthaltende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und konzentriert. Die Reinheit > 90 % (sichtbare Homogenität) wurde mittels SDS-PAGE bestimmt und die Identität mittels massenspektrometrischer Analyse bestätigt. Bei den Trypsiligasevarianten 4 und 5 (exprimiert als aktive Biokatalysatoren) schloss sich als finaler Reinigungsschritt der Biokatalysatoren eine Größenausschlusschromatographie an. Verwendet wurde dabei ein 50 mM HEPES-Puffer pH 7,8 mit 100 mM NaCl. Trypsiligasevarianten-enthaltende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und Fraktionen, welche die Trypsiligasevarianten in zufriedenstellender Reinheit enthielten (sichtbare Homogenität) wurden vereinigt und konzentriert. Die Reinheit > 90 %

(sichtbare Homogenität) wurde mittels SDS-PAGE bestimmt und die Identität mittels massenspektrometrischer Analyse bestätigt.

Die Expression und Reinigung des anti-TNF α Fab-Fragmentes wurde freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher durchgeführt. Dazu wurde erhaltene Plasmid-DNA (Kapitel 4.6.3, Tabelle 3.4) in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Die Expression erfolgte für 12 h bei 30 °C in 1L-Schüttelkolben unter IPTG-Induktion. Die Reinigung des Fab-Fragmentes nach Ultraschallaufschluss erfolgte mittels einer Affinitätschromatographie laut Herstellerangaben der verwendeten *Strep-Trap*TM HP-Säule (Bindepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, Elution: 2,5 mM D-Desthiobiotin in Bindepuffer). Fab-Fragment enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und das Fab-Fragment wurde final mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt (Puffer: 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂). Die Reinheit > 90 % (sichtbare Homogenität) wurde mittels SDS-PAGE bestimmt und die Identität mittels massenspektrometrischer Analyse bestätigt.

4.7.3 Charakterisierung ausgewählter Trypsiligasevarianten

Die Zuordnung einzelner Peaks einer chromatographischen Auftrennung von Reaktionsansätzen zu entsprechenden Edukten und Produkten erfolgte durch massenspektrometrische Analysen in Kombination mit einem Vergleich der Retentionszeiten. Reaktionsausbeuten wurden durch Korrelation der entsprechenden integrierten Peakflächen im HPLC- bzw. UPLC-Profil bei entsprechender Wellenlänge (254 nm oder 280 nm) bestimmt. Die HPLC- bzw. UPLC-chromatographischen Auftrennungen von Reaktionsansätzen erfolgten mit Acetonitril/Wasser-Gemischen, welche mit 0,05 % (v/v) TFA (UPLC) bzw. 0,1 % (v/v) TFA (HPLC) versetzt waren. Die Flussraten betragen 0,5 ml min⁻¹ (UPLC) bzw. 1,0 ml min⁻¹ (HPLC). Es wurden Gradienten von 5–100 % (v/v) Acetonitril in 20 min (HPLC), 5–100 % (v/v) Acetonitril in 5 min (UPLC) und 10–60 % (v/v) Acetonitril in 5 min (UPLC) verwendet. Die initialen Hydrolyse- bzw. Aminolysegeschwindigkeiten wurden durch Regression der linearen Bereiche der Zeit-Umsatz-Kurven erhalten. Für die Herstellung von Stammlösungen der Peptidsubstrate (5–20 mM) wurde Wasser als Lösungsmittel verwendet. Die Reaktionen im 0,1–1,0-ml-Maßstab wurden durch Enzymzugabe gestartet. Für UPLC- und HPLC-Analysen der Reaktionsansätze wurden zu ausgewählten Zeitpunkten Aliquote (10–20 μ l) aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Reaktion wurde durch Zugabe von 20–30 μ l 50%iger (v/v) Essigsäure beendet. Die jeweiligen Reaktionsansätze ohne Biokatalysator wurden als Negativkontrollen durchgeführt.

4.7.3.1 Hydrolysestudien

Die Hydrolysereaktionen wurden bei 30 °C und 500 rpm durchgeführt, wobei die Reaktionsansätze 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 µM ZnCl₂, 1 mM Substrat (Bz-AA_YRHAG) und 7–20 µM Trypsiligasevariante enthielten.

4.7.3.2 Studien zur Bestimmung der Substratpräferenz

Für die Bestimmung der Substratpräferenzen wurden Hydrolysestudien unter Verwendung ausgewählter Peptidsubstrate der allgemeinen Sequenz Bz-AA_Xaa₁Xaa₂Xaa₃AG bei 30 °C und 500 rpm durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 µM ZnCl₂, 1 mM Peptid, 7–20 µM Trypsiligasevariante.

4.7.3.3 Transamidierungsstudien

Die Transamidierungsstudien wurden unter Verwendung der Peptide Bz-AA_XaaRHAG und RHAK bei 30 °C und 500 rpm durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 µM ZnCl₂, 1 mM Acyldonor (Bz-AA_XaaRHAG), 5 mM Acylakzeptor (RHAK), 5–20 µM Enzym.

4.7.3.4 Studien zur pH- und Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivität

Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivität von Trypsiligasevariante 4 wurden die Reaktionsansätze jeweils bei 10 °C, 20 °C, 23 °C, 30 °C und 35 °C bei 500 rpm inkubiert. Die Reaktionsansätze enthielten 1 mM Bz-AA_YRHAG, 100 mM HEPES pH 7,8, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 100 µM ZnCl₂ und 10 µM Trypsiligasevariante 4. Studien zur pH-Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der Trypsiligasevariante 4 wurden unter Verwendung von Bis-Tris-Propan-Puffer mit pH-Werten von pH 6,2, pH 6,6, pH 7,0, pH 7,5, pH 7,8, pH 8,0 und pH 9,0 durchgeführt. Inkubiert wurden alle Reaktionsansätze bei 30 °C und 500 rpm. Die Reaktionsansätze enthielten 1 mM Bz-AA_YRHAG, 100 mM Bis-Tris-Propan pH 6,2–9,0, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 100 µM ZnCl₂ und 10 µM Trypsiligasevariante 4.

4.7.3.5 CD-spektroskopische Untersuchungen

Für die Untersuchung sekundärer Proteinstrukturelemente der Trypsiligasevarianten und der Trypsiligase wurden CD-spektroskopische Untersuchungen im Fern-UV-Bereich zwischen 190 nm und 260 nm herangezogen. Die individuellen CD-Spektren der Trypsiligasevarianten und der Trypsiligase wurden unter Verwendung von 8 µM Enzym in 2 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM CaCl₂, 100 µM ZnCl₂ bzw. 100 µM EDTA bei 20 °C in einer 0,1-cm-Quarzglasküvette aufgenommen. Die Auswertung der CD-Spektren erfolgte nach Abzug der korrespondieren-

den Pufferspektren. Der Temperaturübergang wurde von 20–90 °C (1 °C min^{-1}) bei einer Wellenlänge von 208 nm aufgezeichnet. Der Messansatz enthielt 8 μM Trypsiligasevariante 4, 2 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM CaCl_2 und 80 μM ZnCl_2 .

4.7.3.6 Modifizierung eines ausgewählten Fab-Fragmentes

Die Experimente wurden freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher durchgeführt. Die Einführung einer Fluoreszenzsonde in das anti-TNF α Fab-Fragment katalysiert durch die Trypsiligasevariante 4 erfolgte nach dem Prinzip einer Transamidierung unter Verwendung des Nukleophils RHAK(CF). Das Fab-Fragment war C-terminal mit einer LRH-Erkennungssequenz sowie einem *Strep*-tagII¹⁰ versehen. Der Reaktionsansatz enthielt 100 μM Fab-Fragment, 500 μM Nukleophil RHAK(CF), 100 μM ZnCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 20 μM Trypsiligasevariante 4, 100 mM HEPES pH 7,8. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Für die SDS-PAGE-Analyse der Fab-Modifizierung wurden zu ausgewählten Zeitpunkten 2- μl -Aliquote entnommen und diese wurden mit 20 μl Ladepuffer ohne β -Mercaptoethanol versetzt. Des Weiteren wurde für die massenspektrometrische Analyse ein Aliquot von 3 μl entnommen und dieses wurde mit 30 μl 50%iger (v/v) Essigsäure versetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Auswahl 5 geeigneter Randomisierungsstellen des Zielgens

Die Auswahl der 5 Randomisierungsstellen erfolgte durch eine Strukturanalyse von *wt*-Trypsin und der Sortase A, wobei das Serin 195 als Mittelpunkt eines Radius festgelegt wurde. Von dem Mittelpunkt nach außen gehend wurden 5 hydrophile Aminosäureseitenketten identifiziert, welche als Randomisierungsstellen gewählt wurden. Die drei ausgewählten Aminosäureseitenketten Ser61, Arg62 und Gln64 befinden sich in einem Radius von ~ 20 Å und die zwei Aminosäureseitenketten Ser190 und Gln192 in einem Radius von ~ 10 Å um das Serin 195. Abbildung 5.1 A zeigt die Lokalisation der ausgewählten Randomisierungsstellen in der Proteinstruktur von *wt*-Trypsin sowie die Abstände der Randomisierungsstellen zum Serin 195. Abbildung 5.1 B zeigt die Lokalisation der ausgewählten Randomisierungsstellen (Blau, kursiv) in der Aminosäuresequenz von Trypsiligase. Die Mutationen K60E, N143H, E151H, D189K der Trypsiligase sind Rot hervorgehoben.

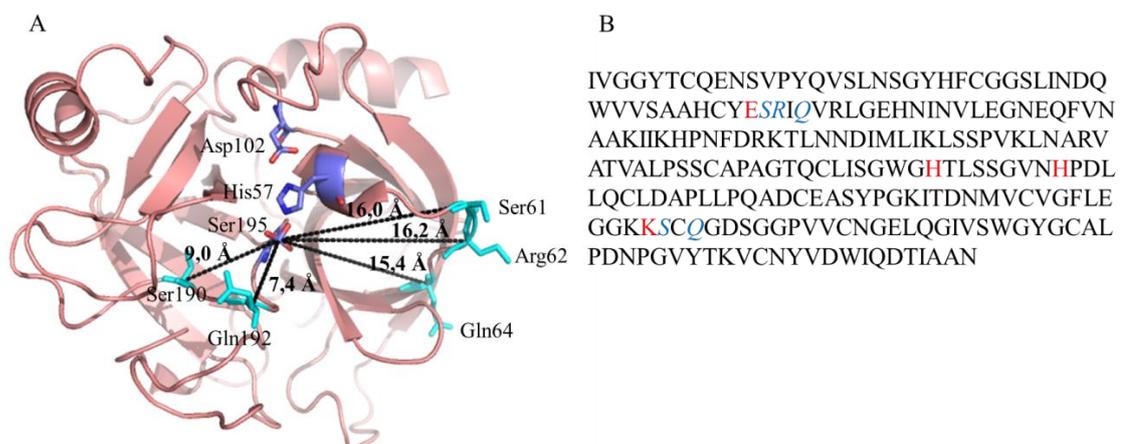


Abbildung 5.1: Darstellung der ausgewählten Randomisierungsstellen im *wt*-Trypsin und in Trypsiligase. **A:** Darstellung der Randomisierungsstellen in der Proteinstruktur von *wt*-Trypsin mit den Abständen der Randomisierungsstellen zum Ser195. Cyan – Randomisierungsstellen S61, R62, Q64, S190 und Q192, Dunkelblau – katalytische Triade, Schwarz – Abstände der Randomisierungsstellen zum Ser195. Pdb: 3FP6. **B:** Aminosäuresequenz der Trypsiligase mit den Randomisierungsstellen S61, R62, Q64, S190 und Q192. Die Randomisierungsstellen sind Blau und kursiv hervorgehoben. Die Mutationen der Trypsiligase K60E, N143H, E151H und D189K sind Rot hervorgehoben.

Durch Auswahl der 5 Randomisierungsstellen zeigen resultierende Trypsiligasevarianten auf Aminosäureebene folgende 9 Mutationen:

K60E/N143H/E151H/D189K/S61Xaa₁/R62Xaa₂/Q64Xaa₃/S190Xaa₄/Q192Xaa₅. Die Aminosäureaustausche K60E/N143H/E151H/D189K resultieren aus der Trypsiligase. Die ausgewählten 5 Aminosäurepositionen wurden im Rahmen der Generierung einer Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene randomisiert.

5.2 Auswahl einer geeigneten Zelllinie

Sowohl zur Generierung einer Bibliothek auf DNA- als auch auf Proteinebene bedarf es der Wahl einer geeigneten *E. coli*-Zelllinie. Für die Analyse der verschiedenen Zelllinien wurde zusätzlich zu dem bereits vorhandenen *MyCUT*-tag¹⁸ ein *Strep*-tagII¹⁹ als Funktionalitätsmarker C-terminal der Trypsiligase eingeführt. Die Einführung des *Strep*-tagsII¹⁹ erfolgte dabei auf DNA-Ebene im mpSCIL-Phagemid. Der *Strep*-tagII¹⁹ diene als Antigen für den verwendeten primären Antikörper. Das resultierende Trypsiligasekonstrukt mit C-terminaler Domäne des pIII-Proteins ist schematisch in 5′–3′-Leserichtung in Abbildung 5.2 gezeigt.



Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Konstruktes aus Trypsiligase, *MyCUT*-tag¹⁸, *Strep*-tagII¹⁹, Amber-Stop-Codon (TAG) und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins.

Mit dem in Abbildung 5.2 dargestellten Konstrukt wurden Überexpressionstests in *E. coli* TGI- und *E. coli* X11 blue-Zellen durchgeführt und mittels *Western Blot* analysiert. Getestet wurde dabei auf eine effektive Suppression des Amber-Stop-Codons (TAG) *downstream* des *Strep*-tagsII¹⁹ im mpSCIL-Phagemid. Die Ergebnisse der Überexpressionstests sind in Abbildung 5.3 dargestellt.

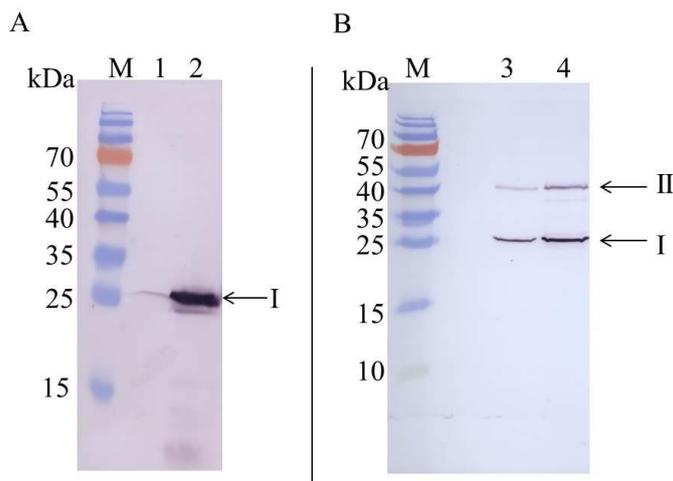


Abbildung 5.3: *Western Blot*-Analysen der Überexpressionstests des Proteinkonstruktes aus Trypsiligase und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins. M: Proteinstandard (*PageRuler*TM *prestained*), I: Trypsiligase_*MyCUT*-tag¹⁸_Strep-tagII¹⁹, II: Trypsiligase_*MyCUT*-tag¹⁸_Strep-tagII¹⁹_pIII. **A:** Zelllinie *E. coli* TGI, 1: Überexpression nach 0,0 h, 2: Überexpression nach 2,0 h. **B:** Zelllinie *E. coli* X11 blue, 3: Überexpression nach 0,0 h, 4: Überexpression nach 1,5 h. Induziert mit 1 mM IPTG bei 37 °C, primärer Antikörper: 2 µg *strepMAB*-Classic, sekundärer Antikörper: *anti*-mouse AP-konjugiert (1:5000), Substrat: BCIP/NBT, Membran: Nitrocellulose. AP: Alkaline Phosphatase, BCIP: 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, NBT: Nitroblau-Tetrazoliumchlorid.

Das Elektropherogramm für die *E. coli* TGI-Zellen in Abbildung 5.3 A zeigt eine prägnante Bande bei etwa 27 kDa (I), welche der Trypsiligase ohne C-terminale pIII-Fusion entspricht

¹⁸ *MyCUT*-tag: EQKLISEENLYFQG [152]

¹⁹ *Strep*-tagII: WSHPQFEK [154]

(27,3 kDa). Das Elektropherogramm für die *E. coli* X11 blue-Zellen in Abbildung 5.3 B hingegen zeigt zwei prägnante Banden bei etwa 27 kDa (I) und 44 kDa (II). Die Bande bei etwa 44 kDa entspricht dem Proteinkonstrukt aus Trypsiligase, MyCUT-tag¹⁸, Strep-tagII¹⁹ und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins (44,6 kDa), welches aus einer nur teilweisen Suppression des Amber-Stop-Codons (TAG) hervorgeht. Durch eine unvollständige Suppression des Amber-Stop-Codons (TAG) konnte auch hier eine Bande bei etwa 27 kDa detektiert werden, welche der Trypsiligase ohne C-terminale pIII-Fusion entspricht. Das Proteinkonstrukt aus Trypsiligase, MyCUT-tag¹⁸, Strep-tagII¹⁹ und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins (II) konnte unter Verwendung der *E. coli* TGI-Zellen jedoch nicht detektiert werden.

Unter Betrachtung der hier gezeigten Ergebnisse wurden die *E. coli* X11 blue-Zellen für die Klonierung einer Trypsiligasebibliothek sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene verwendet.

5.3 Generierung der Trypsiligasebibliothek auf DNA- und Proteinebene

Vor der Generierung der Trypsiligasebibliothek auf DNA- und Proteinebene wurde die Präsentation katalytisch aktiver Trypsiligasevarianten auf der Oberfläche rekombinanter Phagen anhand der Hydrolyse der Erkennungssequenz YRH untersucht. Die proteolytische Spaltung dieser Sequenz stellte eine essentielle Voraussetzung für die Etablierung der Selektionsmethode dar, da ein Substrat mit gleicher Erkennungssequenz verwendet werden sollte. Somit stellte die proteolytische Spaltung der YRH-Erkennungssequenz durch Phagen-präsentierte Trypsiligase auch eine Voraussetzung für das ganze *Phage Display*-Projekt im Rahmen dieser Arbeit dar und wurde daher zu Beginn getestet. Die proteolytische Spaltung der YRH-Erkennungssequenz wurde anhand der Hydrolyse des Modellpeptides Bz-AA^YRHAG gezeigt, die durch Phagen-präsentierte Trypsiligase katalysiert wurde (Abbildung 5.4).

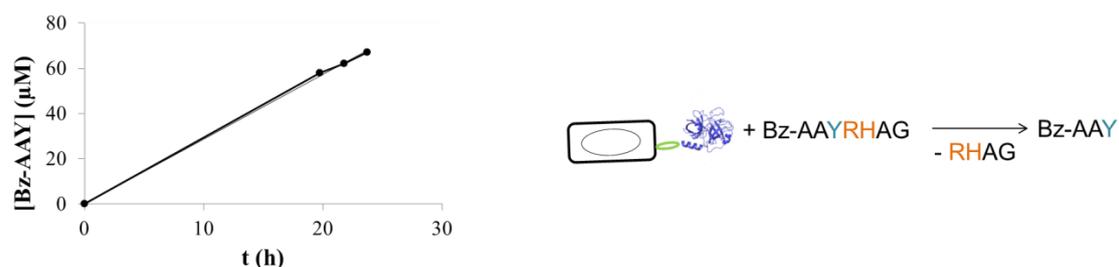


Abbildung 5.4: Hydrolyse des Peptides Bz-AA^YRHAG katalysiert durch Phagen-präsentierte Trypsiligase. Bedingungen: 1mM BzAA^YRHAG, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 25 μ M ZnCl₂, 1×10^8 rekombinante Phagen, 30 °C, 500 rpm. Die Reaktionsansätze wurden zu ausgewählten Zeitpunkten mit 50%iger (v/v) Essigsäure abgestoppt und mittels UPLC bei $\lambda = 280$ nm analysiert. Gezeigt ist die resultierende Zeit-Umsatz-Kurve. Bz: Benzoyl.

In Abbildung 5.4 ist ersichtlich, dass das Modellpeptid Bz-AA_YRHAG durch Phagen-präsentierte Trypsiligase zu dem Produkt Bz-AA_Y hydrolysiert wird. Eine Auftragung der Konzentration an Hydrolyseprodukt gegen die Reaktionszeit und deren lineare Regression ergab einen Umsatz von $2,8 \mu\text{M h}^{-1}$. Das Hydrolyseprodukt wurde massenspektrometrisch eindeutig identifiziert. In einem analogen Reaktionsansatz unter Verwendung von Helferphagen, welche keine Trypsiligase präsentieren, konnte kein Hydrolyseprodukt Bz-AA_Y detektiert werden. Im Anschluss an die Überprüfung der Hydrolyse der YRH-Erkennungssequenz durch Phagen-präsentierte Trypsiligase galt es, eine Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene zu generieren. Verwendete Techniken und Abläufe sind unter Kapitel 4.1.2 beschrieben. Die einzelnen Fragmente, welche für die simultane Restriktions- und Ligationsreaktion eingesetzt wurden, konnten erfolgreich amplifiziert werden. Die simultane Restriktions- und Ligationsreaktion diente der Generierung randomisierter Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten aus den einzelnen Fragmenten. Abbildung 5.5 zeigt die korrespondierenden Elektropherogramme der randomisierten DNA-Fragmente.

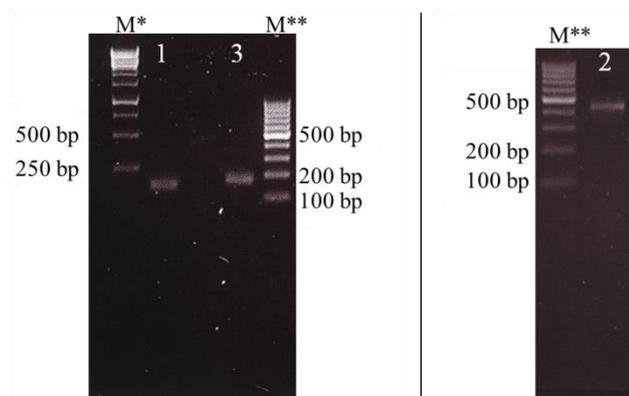


Abbildung 5.5: Elektropherogramme verwendeter und randomisierter DNA-Fragmente zur Klonierung der Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene. Fragment 1: 160 bp, Fragment 2: 423 bp, Fragment 3: 174 bp, Agarosegel mit 2 % (w/v) Agarose, Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion: SYBR® Safe DNA gel stain, DNA-Standard: M* – Gene Ruler™ (1kb), M** – Gene Ruler™ (100 bp).

Nach der simultanen Restriktions- und Ligationsreaktion und einer anschließenden Amplifizierung des Gensyntheseproduktes wurden $10,4 \mu\text{g}$ ligierte DNA-Sequenzen (codierend für die Trypsiligasevarianten) aus den gezeigten einzelnen DNA-Fragmenten erhalten. Diese randomisierten Gensyntheseprodukte wurden anschließend in den mpSCIL ligiert. Zur Komplettierung der Bibliothek auf DNA-Ebene wurde $1 \mu\text{g}$ des Ligationsproduktes in *E. coli* XII blue-Zellen transformiert. $1 \mu\text{g}$ des Ligationsproduktes entspricht etwa $1,7 \times 10^{11}$ DNA-Molekülen. Die Diversität der Bibliothek an Trypsiligasevarianten von $3,4 \times 10^7$ Varianten wurde somit abgedeckt. Durch Auszählen der Kolonien auf den entsprechenden Selektionsplatten wurden

quantitativ 5 % der theoretischen Bibliotheksgröße auf DNA-Ebene bestätigt, was einer Transformationseffizienz von $1,7 \times 10^6$ cfu/ μg^{20} entspricht. Im Rahmen einer qualitativen Analyse der erhaltenen Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene mittels Sangersequenzierung ausgewählter Klone, wurde 1 % der theoretischen Bibliotheksgröße durch fehlerfreie Sequenzierdaten bestätigt. Es wurden hierbei jedoch auch Phagemide ohne offenen Leserahmen identifiziert. Weiterführende qualitative Untersuchungen der zur Ligation in den mpSCIL eingesetzten randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten erfolgten wiederum mittels Sangersequenzierungen, welche in Abbildung 5.6 in Form von Originaldaten gezeigt sind.

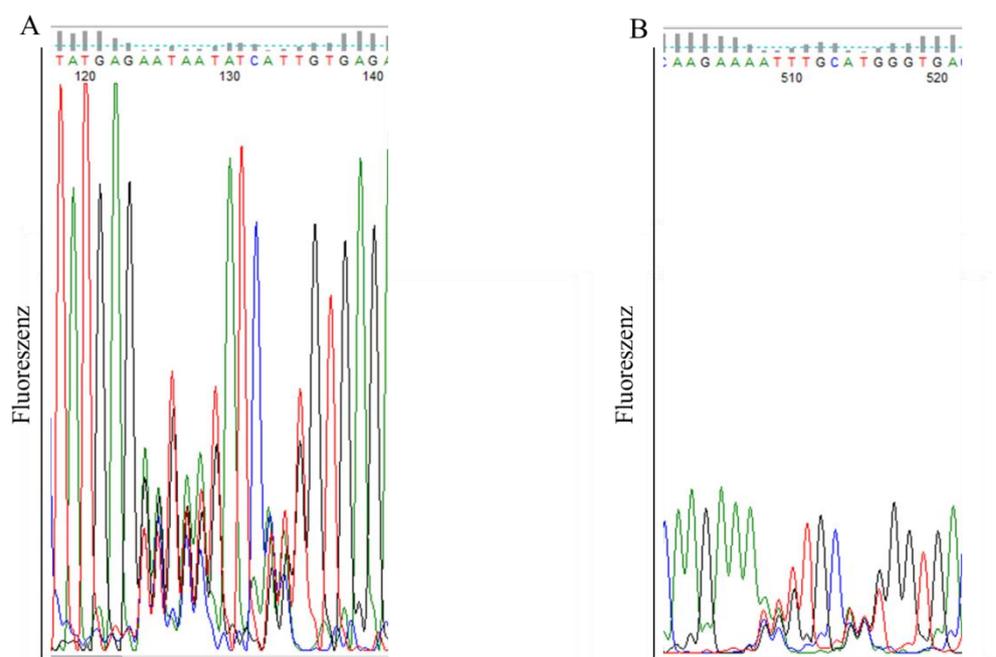


Abbildung 5.6: Chromatogramm der randomisierten DNA-Sequenzen nach Sangersequenzierung. Die untersuchten DNA-Sequenzen codieren für die Trypsiligasevarianten und wurden in den mpSCIL ligiert. Gezeigt sind die Chromatogrammausschnitte an den Randomisierungsstellen. **A:** Randomisierungsstellen für die Aminosäurepositionen S61Xaa₁, R62Xaa₂, Q64Xaa₃. **B:** Randomisierungsstellen für die Aminosäurepositionen S190Xaa₄, Q192Xaa₅.

Das Codon der Basen 124–126 codiert für die Aminosäureposition 61, das Codon der Basen 127–129 für die Aminosäureposition 62, das Codon der Basen 133–135 für die Aminosäureposition 64 (Abbildung 5.6 A). In Abbildung 5.6 B codiert das Codon der Basen 508–510 für die Aminosäureposition 190, das Codon der Basen 514–516 für die Aminosäureposition 192. Zu sehen ist eine Überlagerung von je vier Fluoreszenzsignalen (A, T, G und C) an den ersten zwei Positionen der Codone sowie eine Überlagerung von je zwei Fluoreszenzsignalen (G und T) an den dritten Positionen der Codone, was die Funktionalität der verwendeten

²⁰ Transformationseffizienz bezogen auf mpSCIL-Phagemid-DNA

NNK²¹-Oligonukleotide ebenso bestätigte wie die Randomisierung der korrespondierenden Aminosäurepositionen 61, 62, 64, 190 und 192. Flankierende und interne nicht randomisierte Positionen wiesen keine überlagerten Signale auf. Zur weiteren Überprüfung der randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten hinsichtlich unerwünschter Mutationen wurden die kompletten Daten der Sangersequenzierungen mit der korrespondierenden Sequenz der Trypsiligase verglichen. Hier wurden keine zusätzlichen Mutationen detektiert (Abbildung 5.7), da lediglich die Randomisierungsstellen Unterschiede in den DNA-Sequenzen (Punkte) aufwiesen.

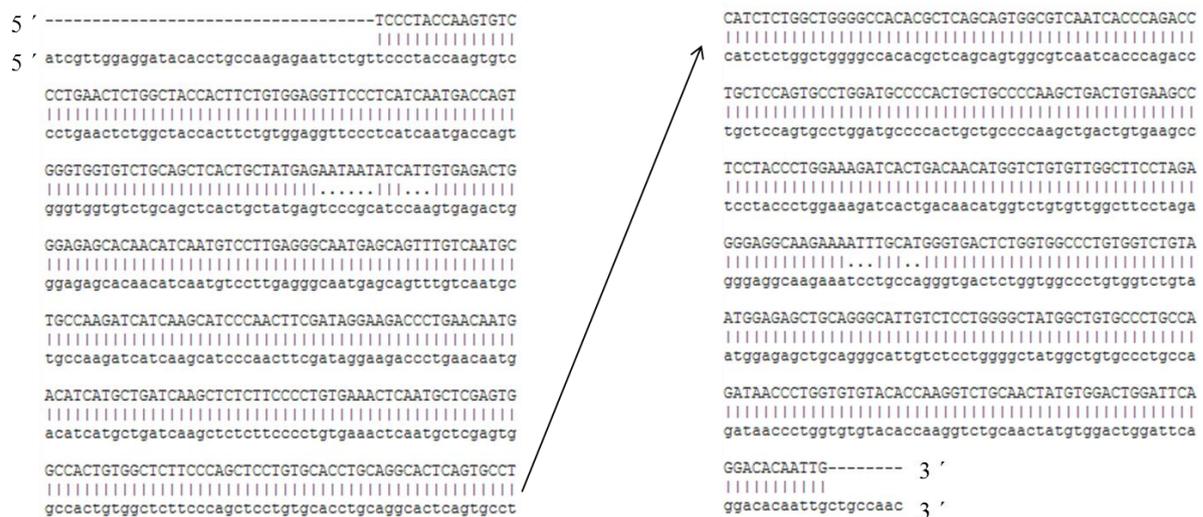


Abbildung 5.7: Paarweises Alignment der randomisierten Gensyntheseprodukte codierend für die Trypsiligasevarianten (Großbuchstaben) mit der DNA-Sequenz codierend für die Trypsiligase (Kleinbuchstaben) in 5′–3′-Leserichtung.

Die hergestellte Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene wurde zur Generierung der Trypsiligasebibliothek auf Proteinebene eingesetzt. Die entsprechenden Bibliotheken auf Proteinebene wurden mit Konzentrationen von 10⁸–10¹⁰ Phagen pro Milliliter generiert.

5.4 Etablierung einer geeigneten Selektionsmethode

5.4.1 Untersuchung ausgewählter Selektionsbedingungen

Der Einfluss zweiwertiger Metallionen (Ca²⁺, Zn²⁺) auf die Fibrillenbildung rekombinanter filamentöser Phagen wurde mittels Streulichtexperimenten untersucht, da die Streulichtintensität mit dem Grad der Fibrillenbildung korreliert werden kann [158]. Je Messung wurden 2 × 10⁶ Trypsiligase-präsentierende rekombinante Phagen eingesetzt. Um zunächst den Einfluss der NaCl-Konzentration im verwendeten Puffer auf die Fibrillenbildung zu untersuchen,

²¹ N – ATGC, K – GT

wurde 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 50 mM bzw. 250 mM NaCl mit steigenden CaCl_2 -Konzentrationen getestet (Abbildung 5.8 A).

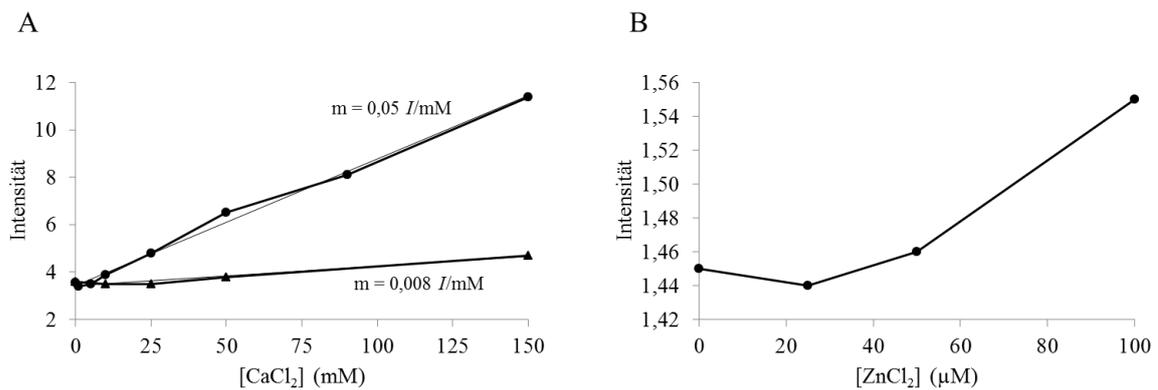


Abbildung 5.8: **A** – Streulichtintensität I in Abhängigkeit der CaCl_2 -Konzentration unter Verwendung von 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit zwei verschiedenen NaCl-Konzentrationen. Die Streulichtintensitäten I wurden bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 375 nm gemessen [158]. Bedingungen: 2×10^6 Trypsiligase-präsentierende rekombinante Phagen, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl (\blacktriangle) bzw. 50 mM NaCl (\bullet), 0–150 mM CaCl_2 , 30 °C (verwendete CaCl_2 -Konzentrationen (\bullet): 0, 1, 5, 10, 25, 50, 90, 150 mM; verwendete CaCl_2 -Konzentrationen (\blacktriangle): 0, 10, 25, 50, 150 mM). **B:** Streulichtintensität I in Abhängigkeit der ZnCl_2 -Konzentration unter Verwendung von 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 250 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 . Die Streulichtintensitäten I wurden bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 375 nm gemessen [158]. Bedingungen: 2×10^6 Trypsiligase-präsentierende rekombinante Phagen, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0–100 μM ZnCl_2 , 30 °C (verwendete ZnCl_2 -Konzentrationen: 0, 25, 50, 100 μM).

Anhand Abbildung 5.8 A wird deutlich, dass sich eine höhere NaCl-Konzentration negativ auf die Fibrillenbildung auswirkt. Bei der Verwendung von 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit einem NaCl-Gehalt von 250 mM (\blacktriangle) ist der Anstieg der Streulichtintensität bei steigender CaCl_2 -Konzentration um einen Faktor 6 geringer als unter Verwendung von 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 50 mM NaCl (\bullet). Unter Verwendung von 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 250 mM NaCl wurde ein Anstieg der Streulichtintensität erst ab einer CaCl_2 -Konzentration von 25 mM beobachtet. Unter Verwendung von 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 50 mM NaCl hingegen wurde ein Anstieg der Streulichtintensität bereits ab einer CaCl_2 -Konzentration von 5 mM beobachtet. Abschließend wurde untersucht bei welcher ZnCl_2 -Konzentration unter Verwendung von 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 250 mM NaCl und 5 mM CaCl_2 die Fibrillenbildung einsetzt (Abbildung 5.8 B). Hier konnte ab einer ZnCl_2 -Konzentration von 50 μM ein Anstieg der Streulichtintensität beobachtet werden.

Für künftige Studien wurden 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 250 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 und 25 μM ZnCl_2 gewählt. Der Puffer aus 50 mM Tris/HCl pH 7,5 und 250 mM NaCl entspricht im Folgenden TBS.

Final wurde die Transamidierungsreaktion für das Substratepaar Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG und RHAADapAbz unter den zuvor ermittelten Pufferbedingungen analysiert, wobei Trypsiligase als Biokatalysator eingesetzt wurde. Da das Substratepaar für die Selektionsmethode verwendet werden sollte, wurde die Eignung der Peptide für eine Trypsiligase-katalysierte Transamidierungsreaktion getestet. Die Trypsiligase diente hierbei als Modellsystem für die Bibliothek an Trypsiligasevarianten. Das HPLC-Profil des Reaktionsansatzes der Transamidierung zu ausgewählten Zeitpunkten mit dem ESI-Massenspektrum des Transamidierungsproduktes ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

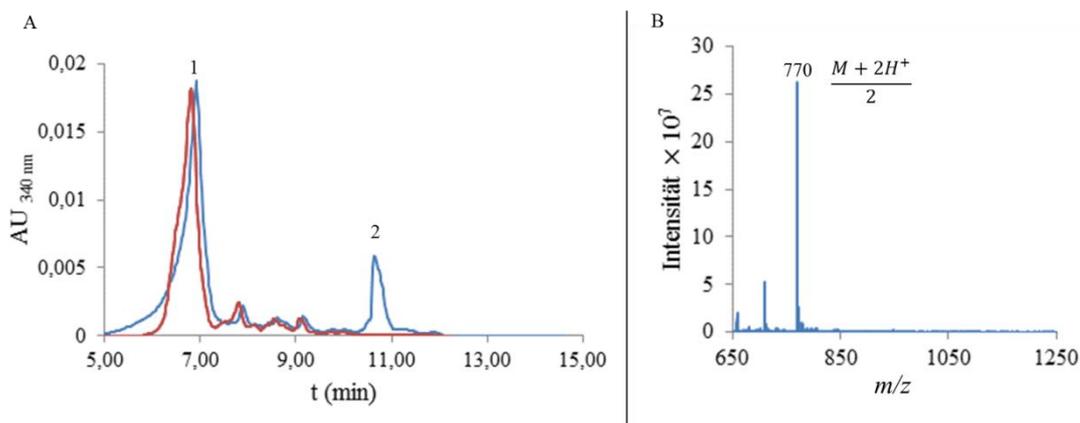


Abbildung 5.9: **A** – HPLC-Chromatogramm des Reaktionsansatzes der Transamidierungsreaktion von Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG und RHAADapAbz zu Bio(PEG)₂-GAAYRHAADapAbz katalysiert durch Trypsiligase. Bedingungen: 500 μ M Acyldonor (Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG), 1 mM Acylakzeptor (RHAADapAbz), 5 μ M Trypsiligase, 25 μ M ZnCl₂, 5 mM CaCl₂, 250 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 30 °C, 500 rpm. Die Reaktionsansätze wurden zu ausgewählten Zeitpunkten mit 50%iger (v/v) Essigsäure abgestoppt und mittels HPLC bei $\lambda = 340$ nm analysiert. Rot: 0 min, Blau: 30 min. Peak 1 (Retentionszeit 6,8 min): Acylakzeptor RHAADapAbz, Peak 2 (Retentionszeit 10,6 min): Transamidierungsprodukt Bio(PEG)₂-GAAYRHAADapAbz. HPLC-Bedingungen: 5–100 % (v/v) Acetonitril in 20 min, $\lambda = 340$ nm. **B:** ESI-Massenspektrum des Produktpeaks mit einer Retentionszeit von 10,6 min, $m/z_{\text{ber.}}$: 1537, $m/z_{\text{gef.}}$: 770 ± 1 ($(M + 2H^+)/2$). Bio: Biotinyl, PEG: Polyethylenglykol, Dap: 2,3-Diaminopropionsäure, Abz: 2-Aminobenzoessäure.

Der Peak mit einer Retentionszeit von 10,6 min in Abbildung 5.9 A konnte massenspektrometrisch eindeutig als das gewünschte Transamidierungsprodukt

Bio(PEG)₂-GAAYRHAADapAbz identifiziert werden (Abbildung 5.9 B), wobei der verbliebene Acylakzeptor eine Retentionszeit von 6,8 min aufwies (Abbildung 5.9 A). Die Funktionalität der Trypsiligase unter den gewählten Pufferbedingungen und die Eignung der gezeigten Substrate für die Selektion wurde somit bestätigt. Die Ausbeute an gewünschtem Transamidierungsprodukt lag nach 30 min bei 28 % bezogen auf den Acyldonor.

Die Zugänglichkeit des immobilisierten Peptides Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG für die Trypsiligasevarianten wurde durch eine Hydrolysereaktion untersucht. Das Peptid wurde hierbei an Streptavidin-*beads* immobilisiert und nach mehreren Waschschritten mit gereinigter Trypsiligase inkubiert. Der Überstand wurde massenspektrometrisch analysiert, wobei das gewünschte Hydrolyseprodukt RHAAG eindeutig identifiziert werden konnte (Abbildung 5.10).

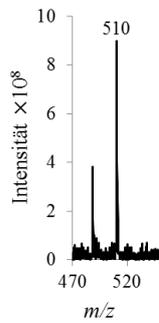


Abbildung 5.10: ESI-Massenspektrum der Hydrolyse-reaktion des immobilisierten Peptids Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG katalysiert durch Trypsiligase. Bedingungen: 0,9 nmol Peptid, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 μ M ZnCl₂, 5 mM CaCl₂, 5 μ M Trypsiligase, Reaktionszeit: 45 min, 30 °C, 500 rpm, $m/z_{\text{ber.}}$ RHAAG: 511, $m/z_{\text{gef.}}$: 510 ± 1 (M + H⁺).

5.4.2 Selektionsverfahren unter Verwendung von Streptavidin-coated-96-well-Platten

Als Ausgangspunkt der Entwicklungs- und Optimierungsstudie einer Selektionsmethode mit der es möglich sein sollte, Trypsiligasevarianten mit einer – im Vergleich zur Trypsiligase – verminderten Sekundärhydrolysegeschwindigkeit zu identifizieren, wurde ein Selektionsverfahren unter Verwendung von Streptavidin-coated-96-well-Platten angewandt. Dieses wurde zunächst theoretisch entwickelt und das Ergebnis ist schematisch in Abbildung 5.11 dargestellt.

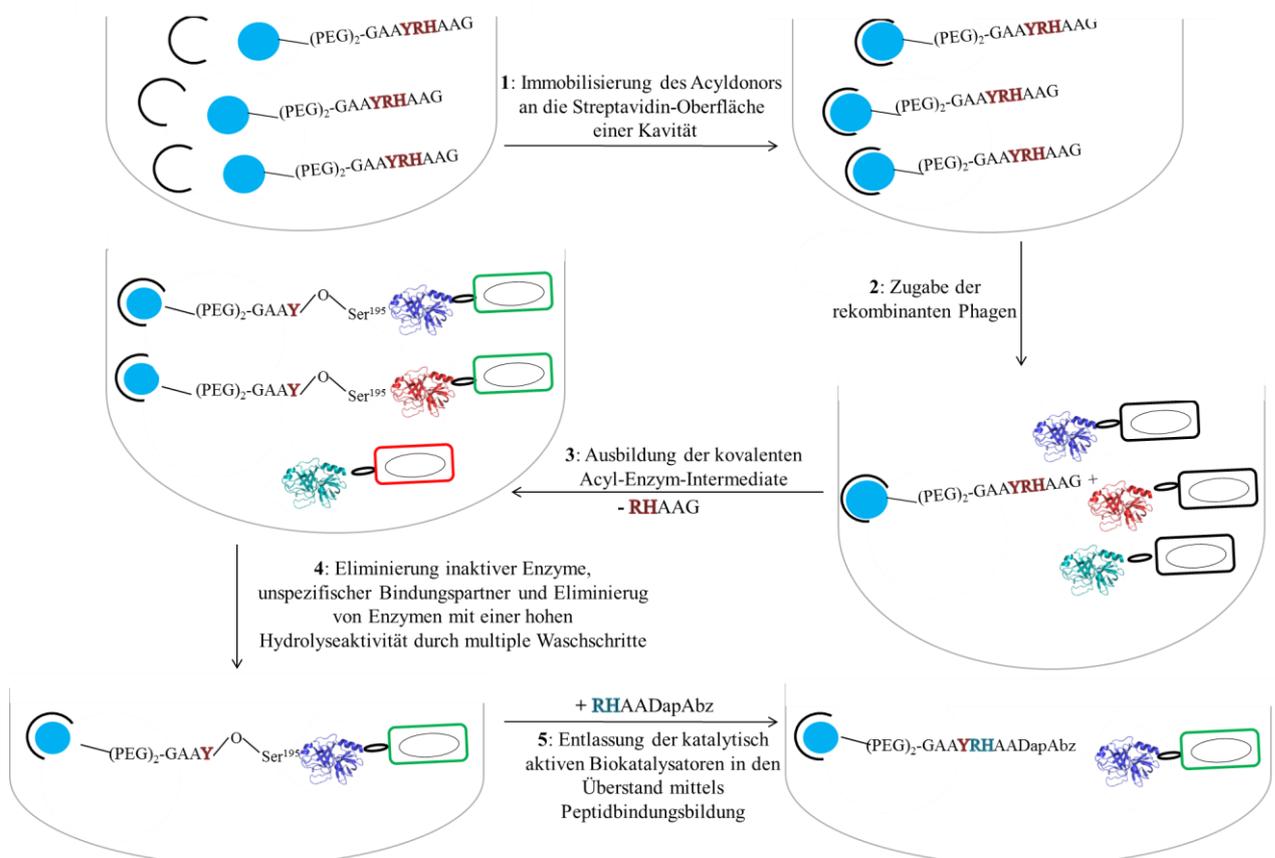


Abbildung 5.11: Schematischer Ablauf des durchgeführten Selektionsverfahrens. Die genauen Reaktionsbedingungen der individuellen Schritte sind unter Kapitel 4.4.1 beschrieben. Blaue Kugel: Biotinyl, PEG: Polyethylenglykol, schwarzer Halbkreis: Streptavidin, Dap: 2,3-Diaminopropionsäure, Abz: 2-Aminobenzoessäure.

1: Immobilisierung des Acyldonors an die Streptavidin-Oberfläche einer Kavität der verwendeten 96-well-Platte. **2:** Zugabe der rekombinanten Phagen. **3:** Inkubation des Acyldonors mit rekombinanten Phagen. Trypsiligasevarianten welche die Tyr-Arg-Peptidbindung der Erkennungssequenz YRH in Anwesenheit von Zinkionen spalten können, bilden ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat aus. **4:** Eliminierung inaktiver Biokatalysatoren, unspezifischer Bindungspartner und Eliminierung von Trypsiligasevarianten mit hoher Peptidhydrolysegeschwindigkeit.

keit durch multiple Waschschrte. **5:** Trypsiligasevarianten, die ein peptisches Substrat als Acylakzeptor akzeptieren, werden durch eine Peptidbindungsbildung eluiert.

Initial wurden $1,9 \times 10^8$ rekombinante Phagen in der ersten Selektionsrunde eingesetzt. Die Selektion erfolgte wie unter Kapitel 4.4.1 beschrieben. Es wurden drei Selektionsrunden mit einer steten Erhöhung des Selektionsdruckes durchgeführt. Der Selektionsdruck wurde durch eine Steigerung der Anzahl an Waschschrten und durch eine Steigerung der Inkubationsdauer der kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate in wässriger Lösung erhöht. Die Quantifizierung der erhaltenen rekombinanten Phagen nach den einzelnen Schritten erfolgte durch deren Titration mittels *E. coli Xll blue*-Zellen. Zur Visualisierung des Effektes einer spezifischen Elution der rekombinanten Phagen durch das Nukleophil RHAADapAbz wurde die Zahl der erhaltenen rekombinanten Phagen im Elutionsschritt der vom letzten Waschschrte gegenüber gestellt (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Ergebnis des Selektionsverfahrens unter Verwendung von Streptavidin-coated-96-well-Platten. Aufgeführt ist die Anzahl der auf den Selektionsplatten befindlichen Klone nach Titration mit *E. coli Xll blue*-Zellen. Dap: 2,3-Diaminopropionsäure, Abz: 2-Aminobenzoessäure.

	Anzahl der Klone nach Titration
Letzter Waschschrte mit TBS	12
Elutionsschritt mit RHAADapAbz	205

Unter Verwendung dieses Auswahlverfahrens wurden 205 Klone nach Elution mit dem Nukleophil RHAADapAbz erhalten, wobei die Anzahl der erhaltenen Klone durch eine unspezifische Elution im letzten Waschschrte um einen Faktor 17 geringer war. Durch die Kultivierung korrespondierender Klone in 5 ml Flüssigkultur und anschließender Sangersequenzierung konnten enthaltene Phagemide auf DNA-Ebene analysiert werden. Jedoch konnten von insgesamt 10 analysierten Klonen nur zwei funktionale Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene bestätigt werden. Die identifizierten Trypsiligasevarianten zeigten die Mutationen K60E/N143H/E151H/D189K/S61A/R62K/Q64P/S190A/Q192H (im Folgenden Trypsiligasevariante 1) und K60E/N143H/E151H/D189K/S61T/R62D/Q64V/S190V/Q192P (im Folgenden Trypsiligasevariante 2). Bei den restlichen Klonen handelte es sich überwiegend um Trypsiligasevarianten mit *frameshift*-Mutationen in deren DNA-Sequenzen. In weiteren Studien wurde daher untersucht, bei welchem Schritt diese Mutationsereignisse auftreten (Kapitel 5.4.2.1).

5.4.2.1 Stabilität der Phagemid-DNA

Für Studien zur Stabilität der Phagemid-DNA wurde ein mittels Sangersequenzierung bestätigter Phagemid in *E. coli Xll blue*-Zellen transformiert. Der Phagemid enthielt die DNA-

Sequenz, die für Trypsiligase codiert, im offenen Leserahmen. Ein Klon der Selektionsplatte wurde anschließend für die Phagenamplifizierung eingesetzt. Nach Titration resultierender rekombinanter Phagen mit *E. coli XII blue*-Zellen wurden wiederum Sangersequenzierungen der Phagemide analysiert, die in ausgewählten Klonen enthalten waren. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden anschließend mit der Referenzsequenz (Trypsiligase) verglichen, wobei Mutationsereignisse detektiert werden konnten.

In einem weiteren Schritt erfolgte eine Funktionalitätsanalyse der eingesetzten rekombinanten Phagen in den einzelnen Runden des Selektionsverfahrens mittels ELISA. Von jeder Runde wurden 1×10^8 rekombinante Phagen analysiert, wobei das Vorhandensein eines funktionalen *MyCUT*-tags¹⁸ C-terminal der Trypsiligasevarianten untersucht wurde. Als Negativkontrolle dienten M13KO7-Helferphagen, welche aufgrund eines fehlenden *MyCUT*-tags¹⁸ kein signifikantes Signal hervorrufen. Die Ergebnisse der ELISA-Studien sind in Abbildung 5.12 dargestellt.

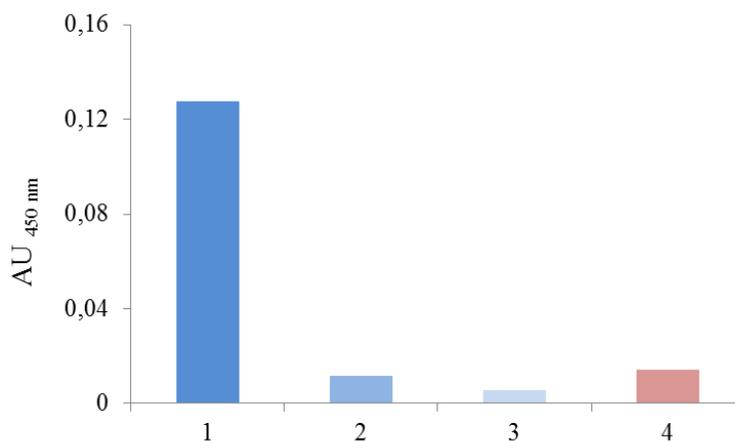


Abbildung 5.12: Analyse der Phagenchargen der einzelnen Selektionsrunden des Selektionsverfahrens aus Kapitel 5.4.2 mittels ELISA. Analysiert wurden jeweils 1×10^8 rekombinante Phagen. 1: rekombinante Phagen eingesetzt in Runde 1, 2: rekombinante Phagen eingesetzt in Runde 2, 3: rekombinante Phagen eingesetzt in Runde 3, 4: M13KO7-Helferphagen. Primärer Antikörper: 0,25 μ g anti-c-Myc, sekundärer Antikörper: anti-M13 HRP-konjugiert (1:5000), Substrat: TMB one. HRP: Horseradish Peroxidase, TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

Unter Betrachtung von Abbildung 5.12 wird ersichtlich, dass nur bei der Phagencharge 1 ein positives Absorptionssignal detektiert werden konnte. Diese Phagencharge wurde direkt unter Verwendung der Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene amplifiziert und für die erste Runde des Selektionsverfahrens eingesetzt. Das Absorptionssignal überstieg mit etwa 0,13 Absorptionseinheiten jenes der Negativkontrolle um einen Faktor 9. Die Phagenchargen nach der ersten bzw. zweiten Runde im Selektionsverfahren (Chargen 2 und 3) zeigten mit etwa 0,01 Absorptionseinheiten den gleichen Wert auf wie die Negativkontrolle, was einen unfunktionalen *MyCUT*-tag¹⁸ und somit auch eine unfunktionale Trypsiligasevariante bestätigte. Die hier be-

schriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Stabilität der Phagemid-DNA bereits nach einmaliger Phagenamplifizierung nicht gewahrt werden kann. In den folgenden Selektionsverfahren wurde daher auf die Durchführung mehrerer Selektionsrunden verzichtet.

5.4.3 Etablierung eines Selektionsverfahrens in Lösung

Zur Minimierung von möglichen unspezifischen Interaktionen der rekombinanten Phagen mit der Polystyroloberfläche der Streptavidin-coated-96-well-Platten wurde ein Selektionsverfahren in Lösung etabliert. Auch hier erfolgte die Entwicklung des Versuchsaufbaus theoretisch. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.13 schematisch dargestellt.

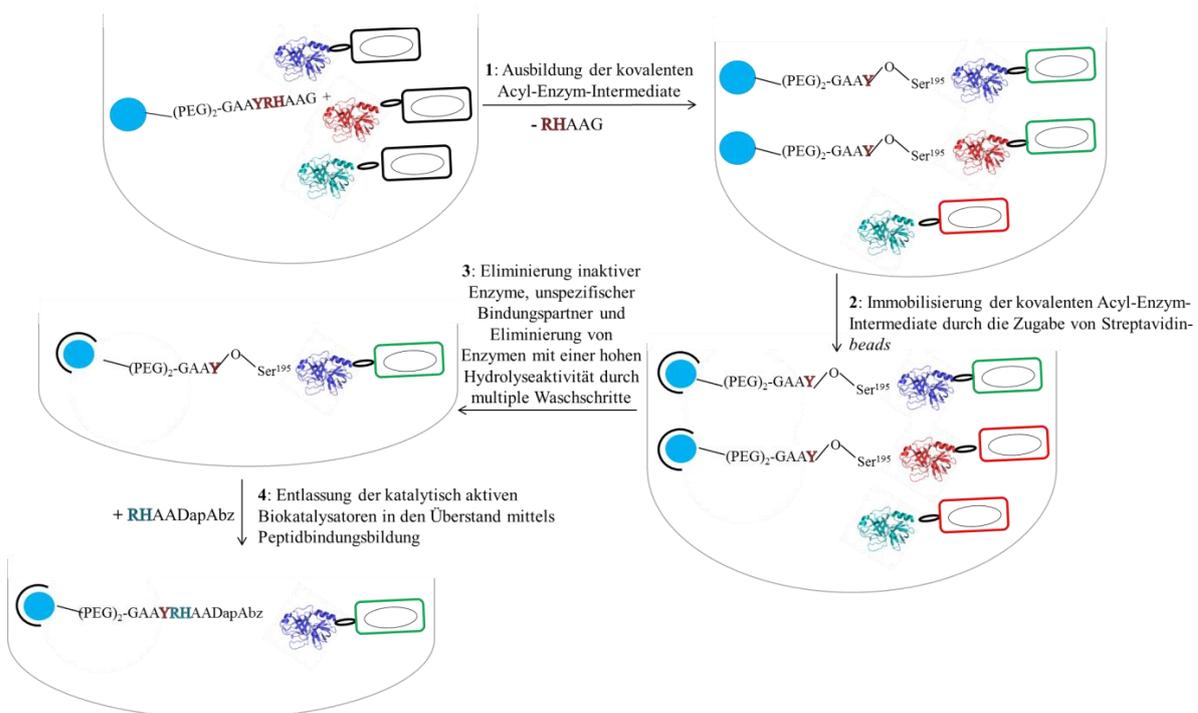


Abbildung 5.13: Schematischer Ablauf des durchgeführten Selektionsverfahrens. Die genauen Reaktionsbedingungen der individuellen Schritte sind unter Kapitel 4.4.2 beschrieben. Blaue Kugel: Biotinyl, PEG: Polyethylenglykol, schwarzer Halbkreis: Streptavidin, Dap: 2,3-Diaminopropionsäure, Abz: 2-Aminobenzoesäure.

1: Inkubation des Acyl-Donors mit rekombinanten Phagen. Trypsiligasevarianten, die die Tyr-Arg-Peptidbindung der Erkennungssequenz YRH in Anwesenheit von Zinkionen spalten können, bilden ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat aus. **2:** Die Trypsiligasevarianten werden gemeinsam mit den jeweiligen rekombinanten Phagen über das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat immobilisiert. **3:** Eliminierung inaktiver Biokatalysatoren, unspezifischer Bindungspartner und Eliminierung von Trypsiligasevarianten mit hoher Peptidhydrolysegeschwindigkeit durch multiple Waschschrte. **4:** Trypsiligasevarianten, die ein peptisches Substrat als Acylakzeptor akzeptieren, werden durch eine Peptidbindungsbildung eluiert.

Als Input für dieses Selektionsverfahren dienten 7×10^7 rekombinante Phagen, welche aus der Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene amplifiziert wurden. Das Selektionsverfahren erfolgte wie unter Kapitel 4.4.2 beschrieben. Zur Visualisierung des Effektes einer spezifischen Elution der rekombinanten Phagen durch das Nukleophil RHAADapAbz wurde auch hier die Zahl der erhaltenen rekombinanten Phagen im Elutionsschritt der vom letzten Waschschrte gegenüber gestellt (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Ergebnis des Selektionsverfahrens in Lösung unter Verwendung von Streptavidin-*beads* mit einer Selektionsrunde. Aufgeführt ist die Anzahl der auf den Selektionsplatten befindlichen Klone nach Titration mit *E. coli XII blue*-Zellen. Dap: 2,3-Diaminopropionsäure, Abz: 2-Aminobenzoesäure.

	Anzahl der Kolonien nach Titration
Letzter Waschschrift mit TBS	15
Elutionsschritt mit RHAADapAbz	235

Unter Verwendung dieses Selektionsverfahrens und einer Selektionsrunde konnten 235 Klone nach Elution mit dem Nukleophil RHAADapAbz erhalten werden, wobei die Anzahl der erhaltenen Klone durch eine unspezifische Elution im letzten Waschschrift um einen Faktor 16 geringer war.

Für die Analyse der erhaltenen 235 Klone wurde ein geeignetes Nachselektionsverfahren etabliert. Im Rahmen von Wachstumsuntersuchungen zweier *E. coli XII blue*-Kulturen stellte sich eine Korrelation der Generationszeit der *E. coli XII blue*-Zellen mit der Präsenz von *frameshift*-Mutationen der Phagemid-DNA heraus. *E. coli XII blue*-Zellen, die Phagemide mit offenen Leserahmen enthielten, wiesen bei 37 °C in 2YT-Medium eine Generationszeit von 190 Minuten auf. Der offene Leserahmen entsprach der Sequenz für Trypsiligase und der C-terminalen Domäne des pIII-Proteins. *E. coli XII blue*-Zellen, die Phagemide mit *frameshift*-Mutationen (ohne offenen Leserahmen) enthielten, zeigten hingegen nur eine Generationszeit von 40 Minuten.

Die erhaltenen 235 Klone wurden daher hinsichtlich ihrer Generationszeit analysiert. Dazu wurden die 235 Klone in je 1 ml 2YT-Medium überführt, welches mit Tetracyclin und Chloramphenicol versetzt wurde. Als Kulturgefäße dienten einzelne Kavitäten einer 96 *deep well*-Platte. Nach einer Vorauswahl wurden die Klone in den Kavitäten H4, H5 und H6 näher analysiert (Abbildung 5.14).

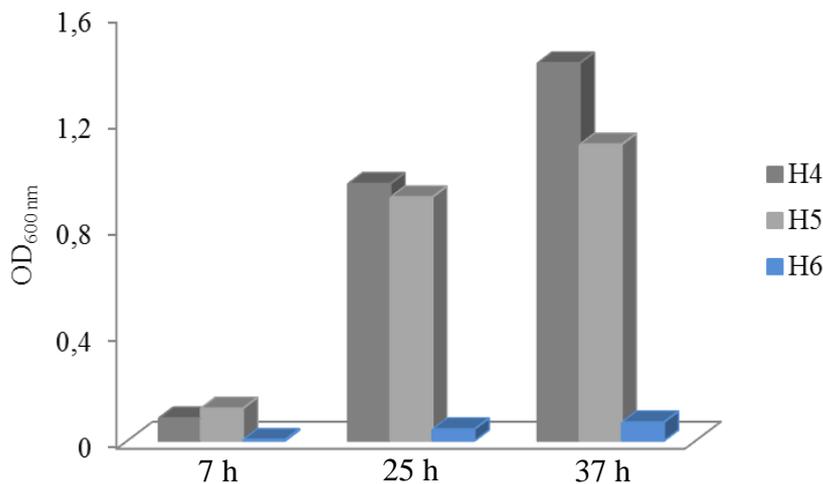


Abbildung 5.14: Wachstumsanalyse ausgewählter Klone in einer 96 *deep well*-Platte. Die untersuchten Klone wurden durch das Selektionsverfahren in Kapitel 5.4.3 (Tabelle 5.2) erhalten. Die Klone wurden durch Titration der rekombinanten Phagen mittels *E. coli X11 blue*-Zellen erhalten. Es wurden korrespondierende Klone der rekombinanten Phagen analysiert, die mit dem Nukleophil RHAADapAbz eluiert wurden. Die OD_{600 nm} der *E. coli*-Kulturen in den Kavitäten H4, H5 und H6 wurde bei drei unterschiedlichen Zeitpunkten (7 h, 25 h, 37 h) ermittelt. Dap: 2,3-Diaminopropionsäure, Abz: 2-Aminobenzoessäure.

Da der Klon aus der Kavität H6 eine hinreichend langsame Wachstumsgeschwindigkeit aufwies ($< 0,5$ OD_{600 nm}-Einheiten in 30 Stunden), wurde der korrespondierende Phagemid einer Sangersequenzierung unterzogen. Anhand der Sangersequenzierung konnte die Trypsiligasevariante **K60E/N143H/E151H/D189K/S61H/R62G/Q64V/S190S/Q192Q** (Trypsiligasevariante 3) identifiziert werden.

5.4.3.1 Steigerung der Konzentration funktionaler rekombinanter Phagen

Zur Steigerung der Konzentration funktionaler rekombinanter Phagen vor der Selektion wurden zwei Lösungsansätze verfolgt. Zum einen sollte die Generationszeit von *E. coli X11 blue*-Zellen mit funktionaler Phagemid-DNA (Phagemide mit offenen Leserahmen) innerhalb einer Flüssigkultur reduziert werden, damit sich nicht überwiegend Zellen mit unfunktionaler Phagemid-DNA (Phagemide ohne offene Leserahmen) in der Flüssigkultur befinden. Eine hohe Konzentration an *E. coli X11 blue*-Zellen in der Flüssigkultur, die Phagemide mit offenen Leserahmen tragen, sollte ihm Rahmen der Amplifizierung rekombinanter Phagen aus dieser Kultur wiederum zu einer erhöhten Konzentration funktionaler rekombinanter Phagen führen. *E. coli X11 blue*-Zellen mit unfunktionaler Phagemid-DNA zeigen, wie bereits unter Kapitel 5.4.3 beschrieben, eine kürzere Generationszeit auf als *E. coli X11 blue*-Zellen mit funktionaler Phagemid-DNA. Realisiert werden konnte eine verkürzte Generationszeit von *E. coli X11 blue*-Zellen mit funktionaler Phagemid-DNA durch Unterdrückung der Basalexpression des verwendeten *tac*-Promotors. Die Unterdrückung der Basalexpression erfolgte durch Zugabe von 20 mM D-Glukose in die Flüssigkultur. Die Generationszeit von *E. coli X11 blue*-Zellen

mit funktionaler Phagemid-DNA bei 37 °C in 2YT-Medium konnte so von 190 Minuten auf 42 Minuten reduziert werden. Eine für die Phagenamplifizierung und -sekretion benötigte Expression der Phagemid-DNA zum Zeitpunkt der Helferphagenzugabe ($OD_{600\text{ nm}}$ von 0,5–0,8) konnte durch eine Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG jedoch nicht erreicht werden, da dies zur Lyse der Zellen bei einer Inkubation von weniger als 5 Stunden führte (Abbildung 5.15). Die Amplifizierung und Sekretion rekombinanter Phagen erfolgt jedoch für ungefähr 18 Stunden. Untersucht wurde hierbei als Modellsystem eine Kultur aus *E. coli X11 blue*-Zellen, die einen durch Sangersequenzierung bestätigten Phagemid mit offenem Leserahmen für Trypsinlase und die C-terminale Domäne des pIII-Proteins trugen.

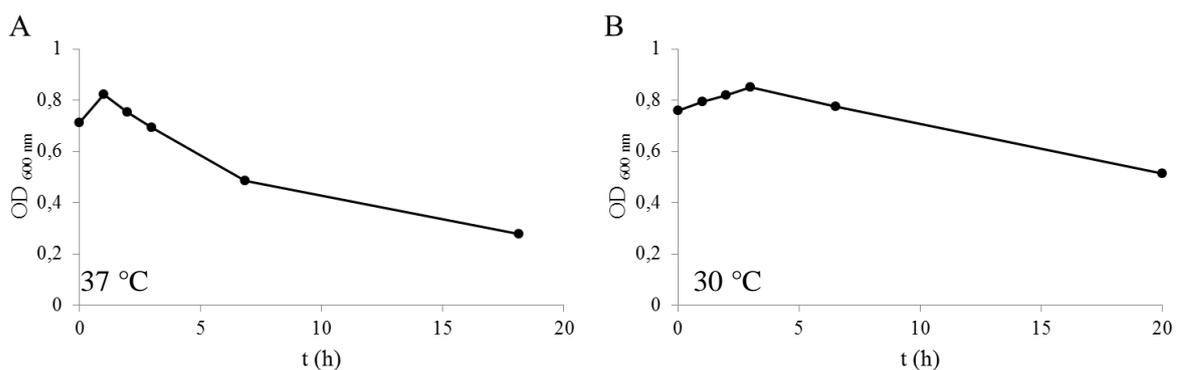


Abbildung 5.15: Wachstumskurven zweier *E. coli X11 blue*-Kulturen nach Induktion der Proteinbiosynthese. Die *E. coli X11 blue*-Zellen wurden mit einem mpSCIL transformiert, der die Sequenz für Trypsinlase und die C-terminale Domäne des pIII-Proteins im offenen Leserahmen enthielt. Als Kulturmedium diente 2YT-Medium plus 20 mM D-Glukose, 34 mg/l Chloramphenicol und 12,5 mg/l Tetracyclin. Inkubiert wurden die Kulturen bei 37 °C (A), 30 °C (B) und 150 rpm. Induziert wurde bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von ungefähr 0,7 mit 1 mM IPTG.

Die Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG erfolgte bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von ungefähr 0,7. Ab diesem Zeitpunkt wurde die optische Dichte in Abhängigkeit der Inkubationszeit verfolgt, da der Zeitraum nach Induktion für die Amplifizierung und Sekretion rekombinanter Phagen entscheidend ist. Die Wachstumskurve nach Induktion in Abbildung 5.15 A zeigt eine einsetzende Lyse der Zellen bereits nach weniger als 5 Stunden. Eine Senkung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 30 °C führte nicht zu einer späteren Lyse der Zellen (Abbildung 5.15 B). Auch hier setzte eine Lyse der Zellen bereits nach etwa 3 Stunden ein.

Für die Gewährleistung der benötigten Expression der Phagemid-DNA im Rahmen der Phagenamplifizierung und -sekretion wurde somit ein modifiziertes Protokoll entwickelt, welches unter Kapitel 4.2.1.2 beschrieben ist. Die zur Amplifizierung und Sekretion der rekombinanten Phagen notwendige Basalexpression des *tac*-Promotors wurde hier nach der Helferphageninfektion durch Aufnahme der Biofeuchtmasse in glukosefreiem Medium gewährleistet.

Zum anderen sollte die Konzentration funktionaler rekombinanter Phagen durch eine Vorselektion gesteigert werden. Diese Vorselektion erfolgte durch eine selektive Antigen-Antikörper-Bindung. Eingesetzt wurden rekombinante Phagen, bei deren Amplifizierung die Basalexpression der Phagemide bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion durch Zugabe von D-Glukose unterdrückt wurde. Das Antigen innerhalb der Vorselektion stellte der *MyCUT*-tag¹⁸ dar, der sich C-terminal der präsentierten Trypsiligasevarianten befindet. Als Antikörper diente immobilisierter anti-c-Myc-Antikörper. Spezifisch gebundene rekombinante Phagen konnten anschließend durch Lösen dieser Antigen-Antikörper-Bindungen eluiert und mittels Titration quantifiziert werden, wobei $2,8 \times 10^3$ rekombinante Phagen von anfangs 10^8 rekombinanten Phagen erhalten wurden. Eine schematische Darstellung dieser *capture*-Experimente ist in Abbildung 5.16 gegeben. Details zur Durchführung sind unter Kapitel 4.2.3 beschrieben.

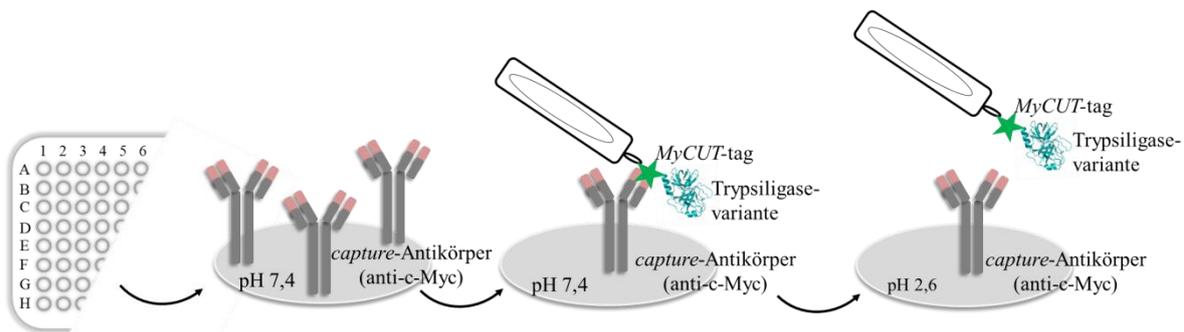


Abbildung 5.16: Schematische Darstellung der *capture*-Experimente.

Zur Bestätigung einer erhöhten Konzentration funktionaler rekombinanter Phagen im Rahmen der Phagenamplifizierung und -sekretion bei Zugabe von D-Glukose bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion wurde das beschriebene *capture*-Experiment zusätzlich mit 10^8 rekombinanten Phagen durchgeführt, welche ohne Glukosezugabe amplifiziert wurden. Das Verhältnis von spezifisch zu unspezifisch (durch Puffer) eluierten Phagen lag hier bei einem Faktor 6. Im Falle der rekombinanten Phagen, welche bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion unter Glukosezugabe amplifiziert wurden, hingegen bei 28. Die Amplifizierung und Sekretion rekombinanter Phagen unter Glukosezugabe bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion führt demnach zu einer gesteigerten Konzentration funktionaler rekombinanter Phagen in der resultierenden Phagenlösung.

5.4.4 Finales Selektionsverfahren optimierter Trypsiligasevarianten

Das hier durchgeführte Selektionsverfahren erfolgte wie bereits unter Abbildung 5.13 gezeigt. Zur Durchführung des finalen Selektionsverfahrens wurde die zuvor beschriebene Vorselektion erneut durchgeführt. Der Überstand der Vorselektion enthielt ca. $2,8 \times 10^3$ rekombinante

Phagen, bei deren Amplifizierung und Sekretion die Basalexpression des Phagemids bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion unterdrückt wurde. Der pH-Wert des erhaltenen Überstandes wurde auf pH 7,5 eingestellt und der neutralisierte Überstand wurde anschließend für die Selektion eingesetzt. Im letzten Waschschriff des Selektionsverfahrens konnten keine rekombinanten Phagen detektiert werden. Durch die Elution mit dem Nukleophil RHAADap-Abz wurden 4 rekombinante Phagen erhalten. Zur Analyse der korrespondierenden Phagemid-DNA wurde diese durch Infektion von *E. coli XII blue*-Zellen in die Zellen gebracht. Durchgeführte Überexpressionstests wurden mittels *Western Blot* analysiert. Im Rahmen dieser Überexpressionstests wurde auch hier die basale Expression zunächst durch Zugabe von 20 mM D-Glukose im Kulturmedium unterdrückt. Die Induktion erfolgte bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von ca. 0,5 mit 1 mM IPTG bei 37 °C. Die Analyse auf ein positives Überexpressionsereignis erfolgte nach 1,0 h und 2,5 h. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.17 anhand des durchgeführten *Western Blots* gezeigt.

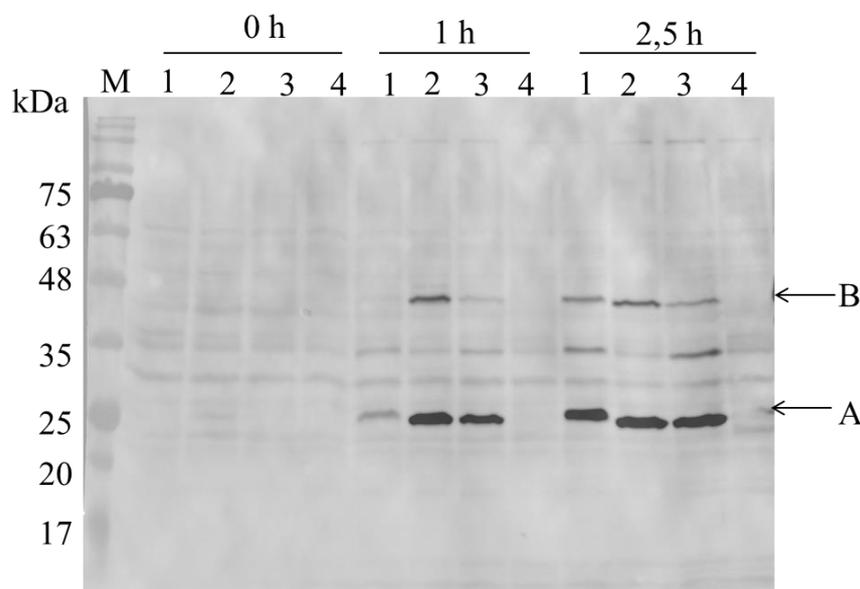


Abbildung 5.17: *Western Blot* zur Analyse von Überexpressionstests. Analysiert wurden Phagemide bzw. entsprechende Klone, die durch das Selektionsverfahren aus Kapitel 5.4.4 identifiziert wurden. M: Proteinstandard (*Protein Molecular Weight Marker PS10 prestained*), 1: Klon 1, 2: Klon 2, 3: Klon 3, 4: Klon 4. Induziert wurde mit 1 mM IPTG bei 37 °C. A: Trypsiligasevariante *MyCUT*-tag¹⁸, B: Trypsiligasevariante *MyCUT*-tag¹⁸_pIII. Primärer Antikörper: 0,25 µg anti-c-Myc, sekundärer Antikörper: *anti-mouse HRP*-konjugiert (1:5000), Substrat: Lumigen PS-3 Acridan, Membran: Nitrocellulose. *HRP*: *Horseradish Peroxidase*.

Anhand Abbildung 5.17 ist ersichtlich, dass in 3 von 4 Klonen ein durch IPTG induzierbarer Phagemid vorhanden war, wobei bei Klon 1, 2 und 3 prägnante Überexpressionsbanden bei etwa 25 kDa und etwa 45 kDa detektiert wurden. Die Proteinbanden von Klon 1 wiesen hierbei generell ein höheres Molekulargewicht auf als jene bei Klon 2 und 3. Anhand Abbildung 5.17 lässt sich ein um ca. 1 kDa erhöhtes Molekulargewicht der Überexpressionsbanden von Klon 1 abschätzen. Bei Klon 4 konnte kein Überexpressionsereignis detektiert werden. Alle

Phagemide wurden anschließend einer Sangersequenzierung unterzogen und die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit einer Referenzsequenz (Gensequenz für Trypsiligase) verglichen. Bei Klon 2 und 3 konnte dabei ein funktionaler Phagemid mit inserierter Sequenz für eine Trypsiligasevariante bestätigt werden. Die Banden auf Höhe von etwa 25 kDa (A) bei Klon 2 und 3 entsprechen dem Konstrukt aus Trypsiligasevariante und *MyCUT*-tag¹⁸ (26,2 kDa), wohingegen die Banden bei etwa 45 kDa (B) dem Konstrukt aus Trypsiligasevariante, *MyCUT*-tag¹⁸ und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins (43,5 kDa) entsprechen. Durch die Analyse von Klon 2 und 3 konnten folgende Trypsiligasevarianten identifiziert werden:

K60E/N143H/E151H/D189K/**S61S/R62S/Q64H/S190G/Q192M** (Trypsiligasevariante 4)
 und K60E/N143H/E151H/D189K/**S61Q/R62Q/Q64Y/S190P/Q192W** (Trypsiligasevariante 5).

Bei den Klonen 1 und 4 konnten hingegen keine funktionalen Phagemide mittels Sangersequenzierung bestätigt werden, da diese Baseninsertionen bzw. -deletionen aufwiesen.

5.5 Identifizierte Trypsiligasevarianten 1–5

Ein DNA-Sequenzalignment der im Rahmen des *Phage Display*-Projektes identifizierten Trypsiligasevarianten 1–5 und der Trypsiligase ist in Abbildung 5.18 in 5′–3′-Leserichtung anhand korrespondierender Phagemide gezeigt.

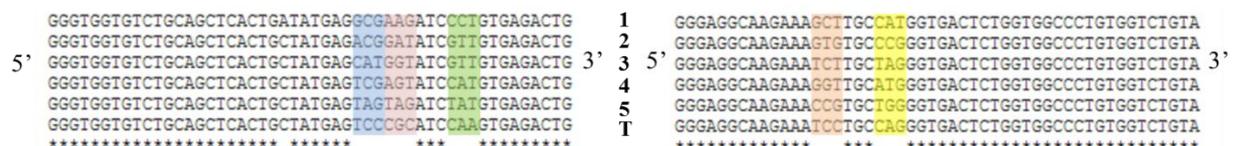


Abbildung 5.18: Multiples DNA-Sequenzalignment der im Rahmen des *Phage Display*-Projektes identifizierten Trypsiligasevarianten 1–5 und der Trypsiligase in 5′–3′-Leserichtung im korrespondierenden Phagemid. *: Identische Base, Leerzeichen: unterschiedliche Base. Blau: Basentriplett codierend für Aminosäureposition 61, Rot: Basentriplett codierend für Aminosäureposition 62, Grün: Basentriplett codierend für Aminosäureposition 64, Orange: Basentriplett codierend für Aminosäureposition 190, Gelb: Basentriplett codierend für die Aminosäureposition 192. 1: Trypsiligasevariante 1, 2: Trypsiligasevariante 2, 3: Trypsiligasevariante 3, 4: Trypsiligasevariante 4, 5: Trypsiligasevariante 5, T: Trypsiligase.

Wie anhand Abbildung 5.18 zu erkennen ist, wiesen alle identifizierten Trypsiligasevarianten in den Aminosäurepositionen 61, 62, 64, 190 und 192 eine randomisierte DNA-Sequenz auf. Trypsiligasevariante 1 wies 3 Basentriplets vor dem Basentriplett codierend für die Aminosäureposition 61 (Blau) ein TGA-Stopcodon auf. Dieses wurde im Rahmen der Klonierung und Expression der Trypsiligasevariante in die Sequenz TGC (Cys) umgewandelt, welche nativ in der Trypsiligase enthalten ist. Trypsiligasevariante 5 wies in den Basentriplets codierend für die Aminosäurepositionen 61 und 62 (Blau und Rot) ein Amber-Stop-Codon (TAG) auf, welches im Rahmen der Klonierung und Expression der Trypsiligasevariante in die Ba-

sensequenz CAA (Gln) umgewandelt wurde. Trypsiligasevariante 3 wies in dem Basentriplett codierend für die Aminosäureposition 192 (Gelb) ebenfalls ein Amber-Stop-Codon (TAG) auf, welches wie für die Trypsiligasevariante 5 in die Basensequenz CAA (Gln) umgewandelt wurde. Die Amber-Stop-Codone wurden in für Glutamin codierende Codone umgewandelt, da die Amber-Stop-Codone von den verwendeten *E. coli X11 blue*-Zellen supprimiert werden können und im Rahmen der Proteinbiosynthese ein Glutamin eingebaut wird. Eine Übersicht identifizierter Trypsiligasevarianten mit den entsprechenden Mutationen auf Aminosäureebene ist in Tabelle 5.3 gezeigt.

Tabelle 5.3: Identifizierte Trypsiligasevarianten mit den entsprechenden Mutationen auf Aminosäureebene. Schwarz: Mutationen innerhalb des anionischen Rattentrypsins für Trypsiligase. Farbig: zusätzliche Mutationen der einzelnen Trypsiligasevarianten innerhalb der Trypsiligase.

Bezeichnung	Mutationen
Trypsiligasevariante 1	K60E/N143H/E151H/D189K/S61A/R62K/Q64P/S190A/Q192H
Trypsiligasevariante 2	K60E/N143H/E151H/D189K/S61T/R62D/Q64V/S190V/Q192P
Trypsiligasevariante 3	K60E/N143H/E151H/D189K/S61H/R62G/Q64V/S190S/Q192Q
Trypsiligasevariante 4	K60E/N143H/E151H/D189K/S61S/R62S/Q64H/S190G/Q192M
Trypsiligasevariante 5	K60E/N143H/E151H/D189K/S61Q/R62Q/Q64Y/S190P/Q192W

5.5.1 Klonierung, Expression und Reinigung der Trypsiligasevarianten

Zur Bereitstellung ausreichender Enzymmengen für geplante Charakterisierungsstudien wurden die in Tabelle 5.3 zusammengefassten Trypsiligasevarianten kloniert, in *S. cerevisiae* exprimiert und gereinigt (Kapitel 4.6.3 und 4.7.2).

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Expression und Reinigung wurde die Reinheit der Trypsiligasevarianten (sichtbare Homogenität) jeweils mittels einer SDS-PAGE bestimmt. Die Identitäten der Trypsiligasevarianten wurden massenspektrometrisch bestätigt. Beispielfür alle generierten Trypsiligasevarianten sind die Ergebnisse dieser Analysen in Abbildung 5.19 anhand der Trypsiligasevariante 4 dargestellt.

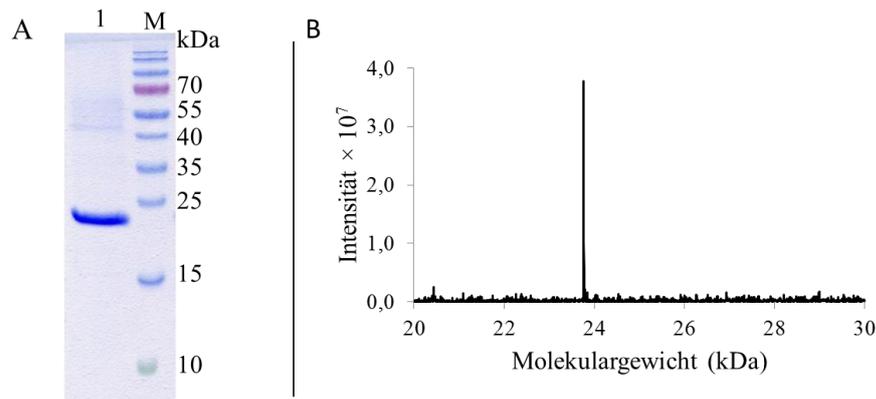


Abbildung 5.19: A – Elektropherogramm der Trypsiligasevariante 4 nach Coomassiefärbung, 15%iges (w/v) SDS-Gel. M: Proteinstandard (*PageRuler™ prestained*), 1: Trypsiligasevariante 4. B: ESI-Massenspektrum der Trypsiligasevariante 4, $M_{\text{ber.}}$: 23,744 kDa, $M_{\text{gef.}}$: 23,743 kDa \pm 0,001 kDa.

Anhand Abbildung 5.19 A konnte für die Trypsiligasevariante 4 eine Reinheit $> 90\%$ (sichtbare Homogenität) bestätigt werden. Die massenspektrometrische Analyse in Abbildung 5.19 B bestätigte zudem die Identität der Trypsiligasevariante. Die Trypsiligasevarianten 1–3 und 5 wurden ebenfalls mit einer Reinheit $> 90\%$ dargestellt und die berechneten Molekulargewichte konnten bestätigt werden (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: Zusammenstellung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen der Trypsiligasevarianten 1–5. Die theoretisch berechneten Molekulargewichte $M_{\text{ber.}}$ sind den experimentell ermittelten $M_{\text{gef.}}$ gegenübergestellt.

	$M_{\text{ber.}}$: (Da)	$M_{\text{gef.}}$: (Da)
Trypsiligasevariante 1	23749	23749 \pm 1
Trypsiligasevariante 2	23756	23755 \pm 1
Trypsiligasevariante 3	23753	23754 \pm 1
Trypsiligasevariante 4	23744	23743 \pm 1
Trypsiligasevariante 5	23947	23947 \pm 1

Nach einer erfolgreichen Darstellung der Trypsiligasevarianten mit Ausbeuten von etwa 6 mg l^{-1} wurden diese hinsichtlich ausgewählter Eigenschaften charakterisiert.

5.5.2 Charakterisierung der Trypsiligasevarianten 1–5

5.5.2.1 CD-spektroskopische Untersuchungen

Zunächst wurden die dargestellten Trypsiligasevarianten hinsichtlich der Integrität sekundärer Proteinstrukturelemente durch das Einführen von 5 weiteren Mutationen (verglichen mit der Trypsiligase) charakterisiert. Die resultierenden CD-Spektren sind für die Trypsiligasevarianten 1–5 im Vergleich zur Trypsiligase in Abbildung 5.20 dargestellt.

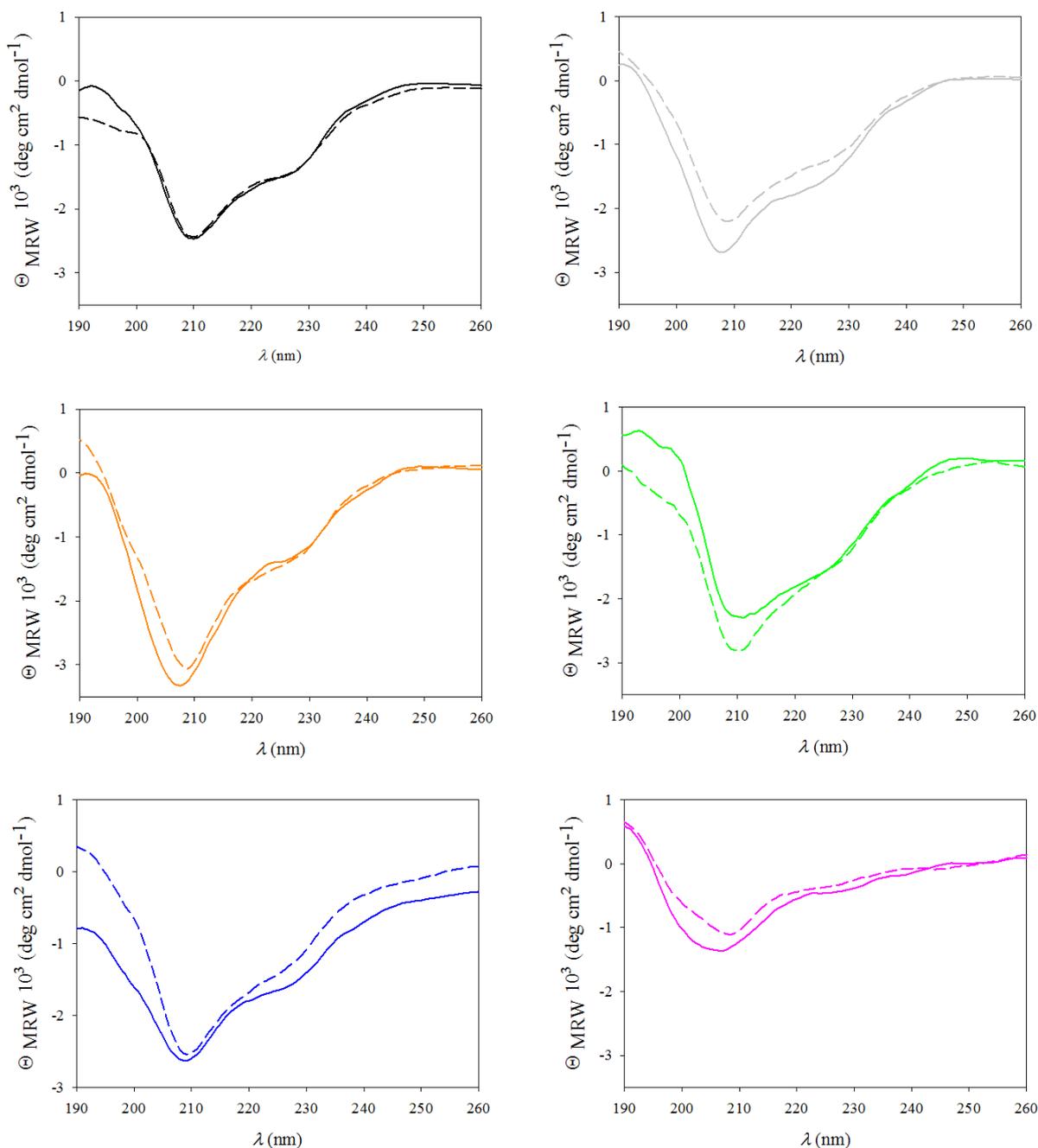


Abbildung 5.20: CD-Spektren der Trypsinligasevarianten 1, 2, 3, 4 und 5 verglichen mit der Trypsinligase (Schwarz). Bedingungen: 8 μM Trypsinligasevariante bzw. Trypsinligase, 2 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 (–) bzw. 100 μM EDTA (– –) bei 20 °C.

Die hier gezeigten CD-Spektren der Trypsinligase und der Trypsinligasevarianten 1–4 weisen in Anwesenheit von ZnCl_2 einen ähnlichen Verlauf auf. Die absoluten Minima dieser Enzyme liegen im Bereich von 208–210 nm mit einer Signalintensität von -2298 bis $-3325 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. Trypsinligasevariante 5 weist im Gesamtverlauf Änderungen auf. Das absolute Minimum liegt hier mit einer verminderten Intensität von $-1336 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ bei 207 nm. Die CD-Spektren der Trypsinligase in Anwesenheit von ZnCl_2 bzw. EDTA sind nahe-

zu deckungsgleich, was bei den Trypsiligasevarianten 1–5 nicht der Fall ist. Der HT-Wert lag bei allen Messungen über den gesamten Wellenlängenbereich unter 500 Volt.

5.5.2.2 Peptidhydrolyseverhalten und Substratpräferenzen

Erste Hydrolysestudien zur Bestimmung von initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeiten identifizierter Trypsiligasevarianten wurden unter Verwendung des Peptides Bz-AAYRHAG durchgeführt. Für diese initialen Studien wurde das Peptid Bz-AAYRHAG als Substrat gewählt, da das Peptid Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG, welches als Substrat für die Selektion eingesetzt wurde, ebenfalls die Erkennungssequenz YRH enthält. Zusammenfassende Ergebnisse sind in Tabelle 5.5 dargestellt.

Tabelle 5.5: Initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v der Trypsiligasevarianten 1–5 für die Erkennungssequenz YRH. Bedingungen: 1 mM Bz-AAYRHAG, 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, 30 °C, 500 rpm, Grau: 20 μ M Trypsiligasevariante 1, Grün: 7 μ M Trypsiligasevariante 3, Blau: 20 μ M Trypsiligasevariante 4, Rot: 20 μ M Trypsiligasevariante 5. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen mit einem Fehler von < 10 %. Bz: Benzoyl.

Biokatalysator	v (min ⁻¹)
Trypsiligasevariante 1	1,2
Trypsiligasevariante 2	- ¹
Trypsiligasevariante 3	1,4
Trypsiligasevariante 4	0,6
Trypsiligasevariante 5	0,5
Trypsiligase	10,0 ²

¹ Für Trypsiligasevariante 2 wurden keine Daten erhoben, da Substrate der allgemeinen Sequenz Bz-AAXaa₁Xaa₂Xaa₃AG für diese Trypsiligasevariante mehr als eine Spaltstelle aufwiesen.

² Ergebnisse wurden von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96]. Bedingungen: 1 mM Peptid, 5 mM PIPES, 2 mM Tris pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, 30 °C, 20 μ M Trypsiligase.

Betrachtet man die in Tabelle 5.5 dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass alle Trypsiligasevarianten im Gegensatz zur Trypsiligase eine deutlich herabgesetzte initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit v gegenüber der Erkennungssequenz YRH zeigen. Die geringste initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit v konnte hierbei für die Trypsiligasevariante 5 mit 0,5 min⁻¹ bestimmt werden. Die höchste initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit v zeigte Trypsiligasevariante 3 mit 1,4 min⁻¹. Somit sind die initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v im Vergleich zur Trypsiligase um einen Faktor 7 (Trypsiligasevariante 3) bis Faktor 20 (Trypsiligasevariante 5) erniedrigt. Für Trypsiligasevariante 2 wurden keine Daten erhoben, da Substrate der allgemeinen Sequenz Bz-AAXaa₁Xaa₂Xaa₃AG für diese Trypsiligasevariante mehr als eine Spaltstelle aufwiesen, was beispielhaft für das Peptid Bz-AAYKHAG gezeigt ist (Abbildung 5.21).

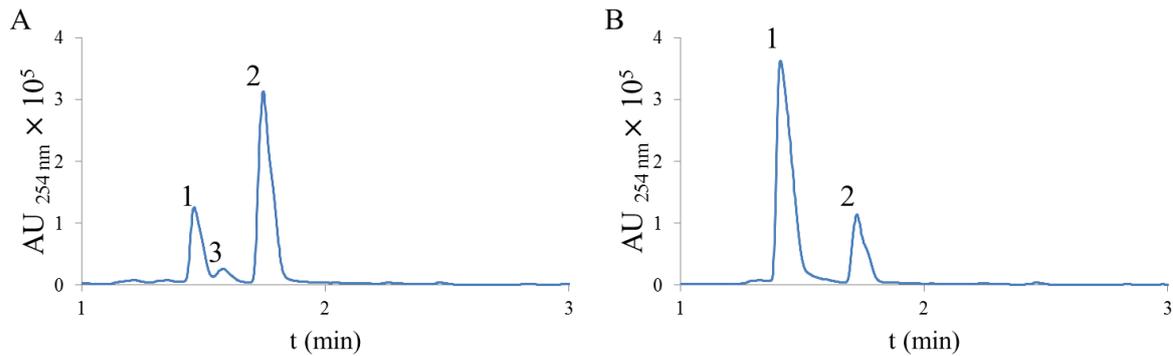


Abbildung 5.21: UPLC-chromatographische Auftrennung des Reaktionsansatzes der Hydrolyse des Peptides Bz-AAYKHAG katalysiert durch die Trypsiligasevariante 2 (**A**) und die Trypsiligasevariante 3 (**B**) nach 30 min Reaktionszeit. Bedingungen: 1 mM Bz-AAYKHAG, 20 μ M Trypsiligasevariante 2 bzw. 7 μ M Trypsiligasevariante 3, 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, 30 °C, 500 rpm. Die Reaktionsansätze wurden zu ausgewählten Zeitpunkten mit 50% iger (v/v) Essigsäure abgestoppt und mittels UPLC bei $\lambda = 254$ nm analysiert. UPLC-Bedingungen: 5–100 % (v/v) Acetonitril in 5 min, $\lambda = 254$ nm. 1: Bz-AAYKHAG, 2: Bz-AAY, 3: Bz-AAYK. Bz: Benzoyl.

Unter Betrachtung der UPLC-chromatographischen Auftrennung des Reaktionsansatzes für die Peptidhydrolysereaktion von Bz-AAYKHAG katalysiert durch die Trypsiligasevariante 2 (Abbildung 5.21 A) wird deutlich, dass zwei Hydrolyseprodukte entstehen (Bz-AAY und Bz-AAYK). Das zusätzliche Hydrolyseprodukt Bz-AAYK (Peak 3) konnte bei der Hydrolysereaktion katalysiert durch Trypsiligasevariante 3 als Referenz hingegen nicht detektiert werden.

Durch das Einführen von 5 Mutationen in die Aminosäuresequenz der Trypsiligase, war eine Veränderung der Substratpräferenzen nicht auszuschließen. Daher wurden die Substratpräferenzen der erhaltenen Trypsiligasevarianten 1, 3, 4 und 5 anhand von Peptidhydrolysestudien unter Verwendung einer Peptidbibliothek untersucht. Verwendet wurde eine Bibliothek aus Heptapeptiden der allgemeinen Sequenz Bz-AAXaa₁Xaa₂Xaa₃AG. Eine Ausnahme war Trypsiligasevariante 2, für die im Rahmen dieser Studien keine initialen Hydrolysegeschwindigkeiten bestimmt wurden, da eine Hydrolyse der Modellpeptide an mehr als einer Spaltstelle erfolgte, was bereits gezeigt wurde (Abbildung 5.21). Zusammenfassende Ergebnisse dieser Peptidhydrolysestudien sind in Abbildung 5.22 A für die übrigen Trypsiligasevarianten 1, 3, 4 und 5 dargestellt. Vergleichende Daten für die Trypsiligase sind in Abbildung 5.22 B zur besseren Vergleichbarkeit dargestellt. Die Daten in Abbildung 5.22 B wurden freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96].

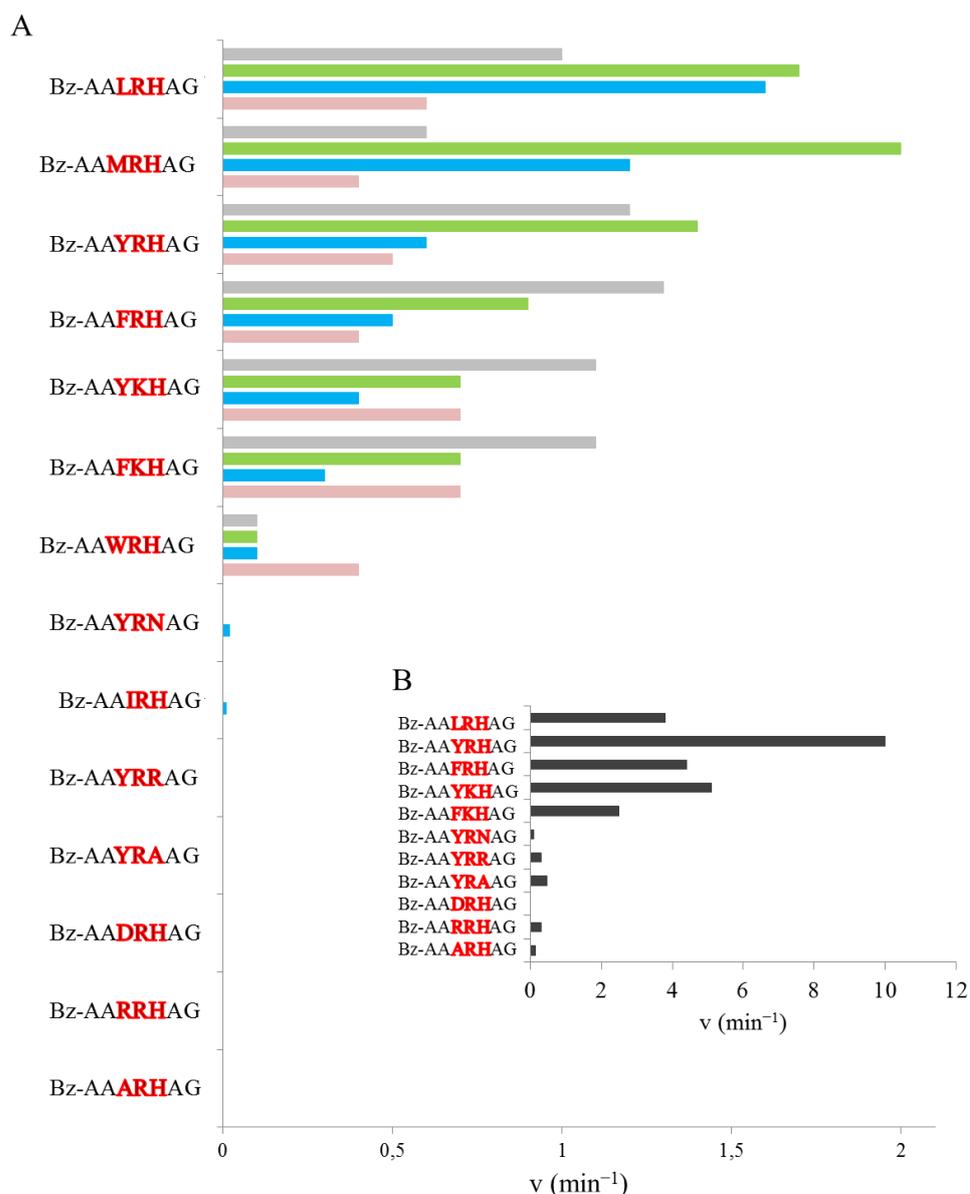


Abbildung 5.22: Initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v ausgewählter Peptidsubstrate katalysiert durch die Trypsiligasevarianten 1, 3, 4 und 5 (A) verglichen mit denen der Trypsiligase (B [96]). Bedingungen A: 1 mM Peptid, 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, 30 °C, 500 rpm, Grau: 20 μM Trypsiligasevariante 1, Grün: 7 μM Trypsiligasevariante 3, Blau: 20 μM Trypsiligasevariante 4, Rot: 20 μM Trypsiligasevariante 5. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert zweier unabhängiger Messungen mit einem Fehler von < 10%. Bedingungen B – die Daten wurden freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96]: 1 mM Peptid, 5 mM PIPES, 2 mM Tris pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, 30 °C, 20 μM Trypsiligase. Bz: Benzoyl.

Anhand Abbildung 5.22 B wird deutlich, dass Trypsiligase als Ausgangsvariante die höchste initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit v für das Peptid Bz-AA^YRRHAG aufweist, was die bereits bekannte Präferenz für Tyrosin im S1-Bindungsort, für Arginin im S1'-Bindungsort und für Histidin im S2'-Bindungsort erkennen lässt [96, 97]. Hinsichtlich der identifizierten Trypsiligasevarianten wurden die höchsten initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v für die Hydrolyse des Peptids Bz-AA^MMRHAG katalysiert durch die Trypsiligasevariante 3 mit 2,0 min^{-1} gefolgt von der Hydrolyse des Peptids Bz-AALRHAG katalysiert durch die Trypsi-

ligasevariante 4 mit $1,6 \text{ min}^{-1}$ gemessen (Abbildung 5.22 A). Für Peptide ohne Histidinseitenkette in P2'-Position konnten keine signifikanten initialen Hydrolysegeschwindigkeiten unter Verwendung der untersuchten Trypsiligasevarianten detektiert werden. Im Gegensatz zu den Trypsiligasevarianten 3 und 4 zeigten die beiden Trypsiligasevarianten 1 und 5 keine eindeutige Diskriminierung zwischen den Peptiden mit den Erkennungssequenzen L/M/F/YRH und Y/FKH. Die Identität aller in diesem Kapitel beschriebenen Hydrolyseprodukte wurde massenspektrometrisch in Kombination mit einem Vergleich der Retentionszeiten bestätigt.

5.5.2.3 Transamidierungsverhalten

Eine Charakterisierung der Trypsiligasevarianten hinsichtlich ihres Transamidierungsverhaltens schloss sich an die Charakterisierung hinsichtlich des Peptidhydrolyseverhaltens an. Eine Übersicht einer solchen Transamidierungsreaktion wurde bereits in Abbildung 1.4 gezeigt. Der schematische Aufbau ist für die Trypsiligase und die Trypsiligasevarianten identisch.

Für eine schnelle Vergleichbarkeit der Trypsiligasevarianten hinsichtlich ihres Transamidierungsverhaltens wurde zudem der Effizienzparameter E eingeführt (Formel 1). Dieser berechnet sich aus der initialen Aminolysegeschwindigkeit (v_A), der initialen Sekundärhydrolysegeschwindigkeit (v_H) und der maximalen Produktausbeute (X_p). Ein hoher Wert für E korrespondiert mit einer hohen Effizienz aufgrund einer niedrigen initialen Sekundärhydrolysegeschwindigkeit im Verhältnis zur initialen Aminolysegeschwindigkeit und der maximalen Produktausbeute.

$$E = v_A \times \frac{X_p}{v_H \times 100} \quad (1)$$

Die initialen Aminolyse- und Sekundärhydrolysegeschwindigkeiten können anhand der entsprechenden Regressionsgeraden der Zeit-Umsatz-Kurven ermittelt werden. Eine exemplarische Darstellung der entsprechenden Regressionsgeraden ist in Abbildung 5.23 A gezeigt.

Aufgrund bereits gezeigter Studien zur Substratpräferenz der Trypsiligasevarianten und zur besseren Vergleichbarkeit mit Trypsiligase wurden für die Trypsiligasevarianten 1 und 5 die Substrate Bz-AA_YRHAG (Acyldonor) und RHAK (Acylakzeptor) verwendet. Das Transamidierungsverhalten von Trypsiligasevariante 2 wurde ebenfalls unter Verwendung der Substrate Bz-AA_YRHAG und RHAK untersucht. Für die Trypsiligasevarianten 3 und 4 wurden die Acyldonorsubstrate aufgrund einer deutlich veränderten Substratpräferenz im S1-Bindungsort angepasst. Für die Trypsiligasevariante 3 wurde als Acyldonor das Peptid Bz-AA_MRHAG und für die Trypsiligasevariante 4 das Peptid Bz-AA_LRHAG eingesetzt. Verwendet wurden 1 mM Acyldonor und 5 mM Acylakzeptor, da dieses Konzentrationsverhältnis für die Trypsi-

ligase in früheren Untersuchungen bereits etabliert wurde [96]. Die Ergebnisse aller Transamidierungsstudien katalysiert durch die Trypsiligasevarianten 1–5 sind in Abbildung 5.23 zusammenfassend und vergleichend mit der Trypsiligase gezeigt.

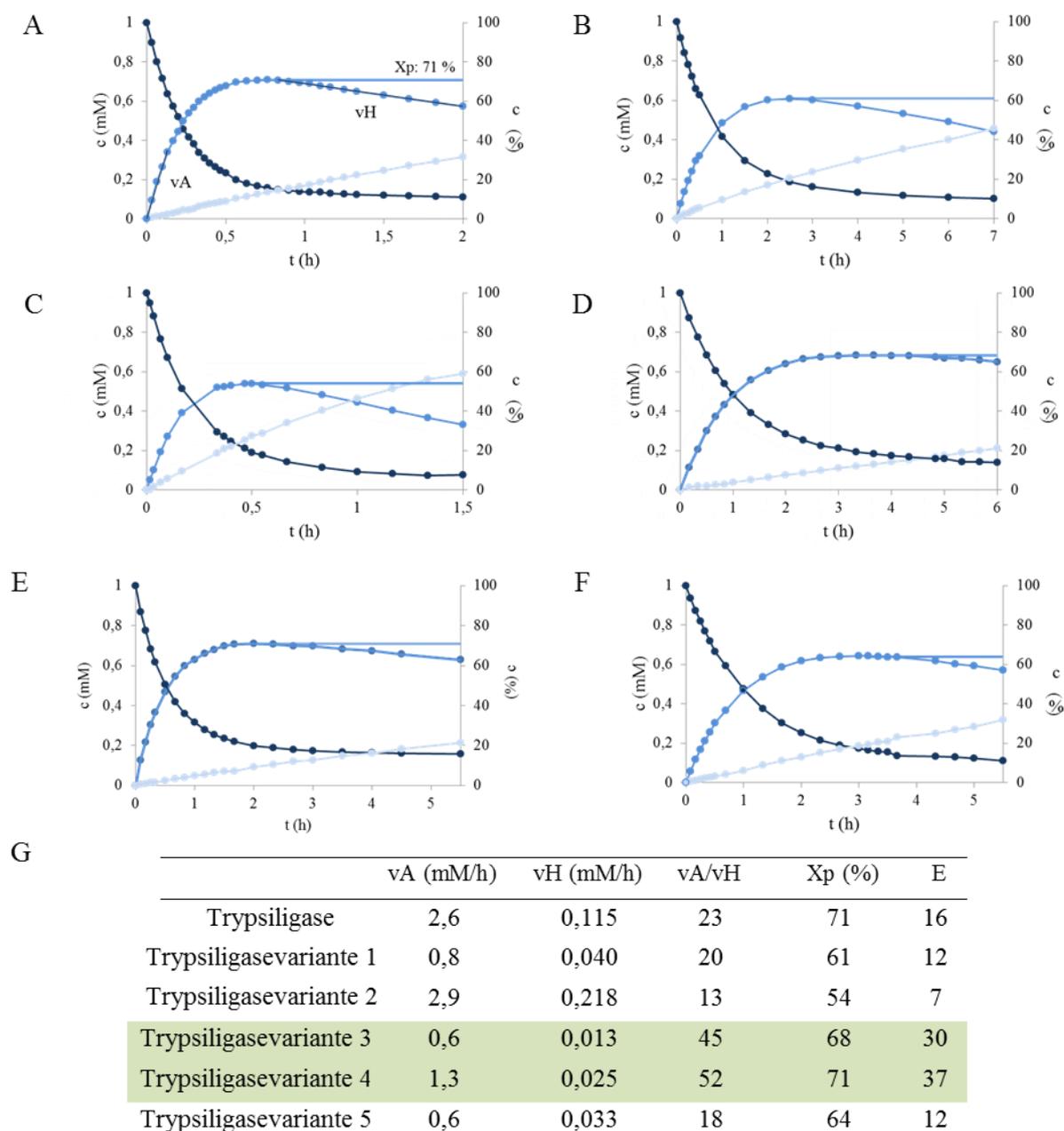


Abbildung 5.23: Transamidierungsreaktionen von Bz-AAXaaRHAG mit RHAK katalysiert durch Trypsiligase und die Trypsiligasevarianten 1–5. Bedingungen: 1 mM Bz-AAXaaRHAG, 5 mM RHAK, 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, 30 °C, 500 rpm, **A:** Trypsiligase (5 μM), Acyldonor: Bz-AAYRHAG, **B:** Trypsiligasevariante 1 (20 μM), Acyldonor: Bz-AAYRHAG, **C:** Trypsiligasevariante 2 (20 μM), Acyldonor: Bz-AAYRHAG, **D:** Trypsiligasevariante 3 (7 μM), Acyldonor: Bz-AAMRHAG, **E:** Trypsiligasevariante 4 (10 μM), Acyldonor: Bz-AALRHAG, **F:** Trypsiligasevariante 5 (20 μM), Acyldonor: Bz-AAYRHAG. Dunkelblau: Bz-AAXaaRHAG, Blau: Bz-AAXaaRHAK, Hellblau: Bz-AAXaa. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung mit einem Fehler von < 5 %. **G:** Tabellarische Zusammenfassung der Transamidierungsparameter. vA: initiale Aminolysegeschwindigkeit, vH: initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit, Xp: maximale Produktausbeute, E: Effizienz der Reaktion. Bz: Benzoyl.

Die Trypsiligasevarianten 1 und 5 wiesen in den ermittelten Transamidierungsparametern ähnliche Werte auf wie die Trypsiligase. Eine Verbesserung einzelner Parameter konnte somit bei diesen Trypsiligasevarianten nicht festgestellt werden. Trypsiligasevariante 2 hingegen wies sogar deutlich verschlechterte Transamidierungsparameter auf. Katalysiert durch Trypsiligasevariante 3 und 4 konnte im Unterschied dazu sowohl das Verhältnis aus initialer Aminolyse- zu Sekundärhydrolysegeschwindigkeit als auch der E-Wert der Reaktion im Vergleich zur Trypsiligase-katalysierten Reaktion um einen Faktor 1,9 bzw. 2,3 gesteigert werden, wobei in allen Fällen nahezu gleiche Produktausbeuten von ca. 70 % erzielt wurden. Die Identität aller hier beschriebenen Transamidierungsprodukte wurde massenspektrometrisch in Kombination mit einem Vergleich der Retentionszeiten bestätigt.

5.5.3 Weiterführende Charakterisierungen der Trypsiligasevariante 4

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse stellte insbesondere die Trypsiligasevariante 4 einen – im Vergleich zum Ausgangsenzym – verbesserten Biokatalysator dar, welcher im Rahmen des *Phage Display*-Projektes identifiziert und somit weiterführend charakterisiert wurde. Für eine universelle Anwendbarkeit der Trypsiligasevariante 4 hinsichtlich ausgewählter Proteinmodifizierungen muss diese in der Lage sein, bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten die gewünschte Reaktion zu katalysieren. Die Bestimmung des Temperaturbereichs, in dem die Trypsiligasevariante 4 katalytische Aktivität zeigt, erfolgte durch Hydrolysestudien des Peptidsubstrates Bz-AAYRHAG bei Temperaturen von 10–35 °C. Die Reaktionsbedingungen wurden in Anlehnung an bereits gezeigte Studien für die Charakterisierung der Trypsiligase als Referenzsystem gewählt [96]. Die resultierenden initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v sind in Abbildung 5.24 A dargestellt. Vergleichende Daten für die Trypsiligase sind in Abbildung 5.24 B zur besseren Vergleichbarkeit dargestellt. Die Daten in Abbildung 5.24 B wurden freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96].

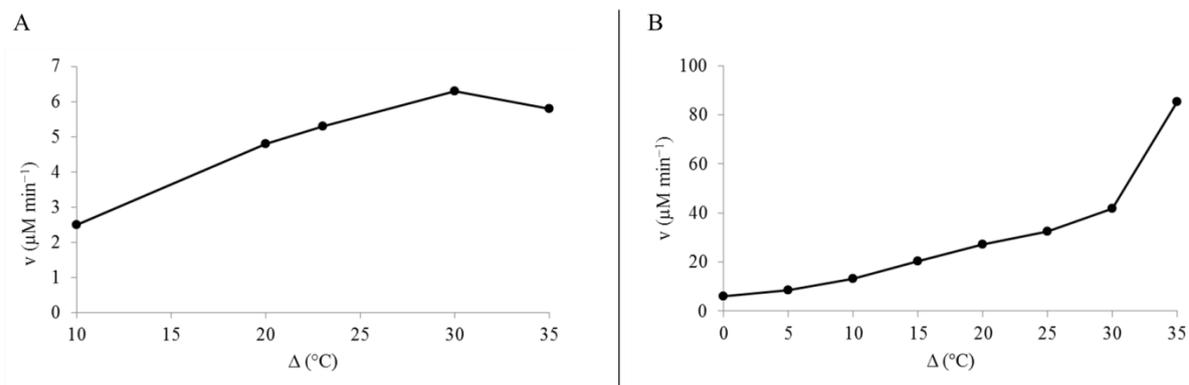


Abbildung 5.24: Temperaturabhängigkeit der initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit v . **A:** Temperaturabhängigkeit der initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit für das Peptid Bz-AAYRHAG katalysiert durch die Trypsiligasevariante 4. Bedingungen: 1 mM Bz-AAYRHAG, 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , 10 μM Trypsiligasevariante 4, 10–35 $^{\circ}\text{C}$, 500 rpm. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen mit einem Fehler von $< 5\%$. **B:** Temperaturabhängigkeit der initialen Hydrolysegeschwindigkeit für das Peptid Bz-AAYRHAAG katalysiert durch die Trypsiligase (Daten wurden von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96]). Bedingungen: 1 mM Bz-AAYRHAAG, 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , 10 μM Trypsiligase, 0–35 $^{\circ}\text{C}$, 500 rpm. Bz: Benzoyl.

Anhand Abbildung 5.24 A ist ersichtlich, dass die Trypsiligasevariante 4 in dem betrachteten Temperaturfenster ein Optimum der katalytischen Aktivität für die untersuchte Reaktion bei 30 $^{\circ}\text{C}$ zeigte. Die geringste katalytische Aktivität konnte in diesen Studien bei einer Temperatur von 10 $^{\circ}\text{C}$ ermittelt werden. So erfolgte der Umsatz des Peptides Bz-AAYRHAG bei dieser Temperatur mit einer initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit v von $2,5 \mu\text{M min}^{-1}$. Die initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit v bei einer Temperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ lag mit $6,3 \mu\text{M min}^{-1}$ um einen Faktor 2,5 höher. Bei einer Temperatur von 35 $^{\circ}\text{C}$ erfolgte die Hydrolyse des Peptides mit einer leicht reduzierten initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit v von $5,8 \mu\text{M min}^{-1}$. Die Trypsiligase zeigt in dem untersuchten Temperaturbereich kein Optimum der katalytischen Aktivität. Die Aktivität dieses Biokatalysators steigt mit zunehmender Temperatur im untersuchten Temperaturbereich von 0–35 $^{\circ}\text{C}$ [96].

Anhand einer Studie zur thermischen Stabilität der Trypsiligasevariante 4 wurde untersucht, ob es eine Korrelation des gezeigten Temperaturoptimums mit strukturellen Änderungen des Enzyms bei Erhöhung der Reaktionstemperatur gibt. Dies erfolgte CD-spektroskopisch durch das Messen von Änderungen in den sekundären Proteinstrukturelementen der Trypsiligasevariante 4 mit steigender Temperatur, wobei der Temperaturübergang von 20–90 $^{\circ}\text{C}$ bei 208 nm verfolgt wurde. Bei dieser Wellenlänge sind die größten Signaländerungen zu erwarten, da hier die Signale der β -Faltblatt-Strukturen dominieren [96]. Der aufgezeichnete Temperaturübergang für die Trypsiligasevariante 4 ist in Abbildung 5.25 A dargestellt, wobei dieser in Analogie zur Bestimmung der Peptidhydrolysegeschwindigkeiten aus Abbildung 5.24 A in Gegenwart von Calciumionen und einem 10-fachen Überschuss an ZnCl_2 verfolgt wurde.

Vergleichende Daten für die Trypsiligase sind in Abbildung 5.25 B zur besseren Vergleichbarkeit dargestellt. Die Daten in Abbildung 5.25 B wurde freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96].

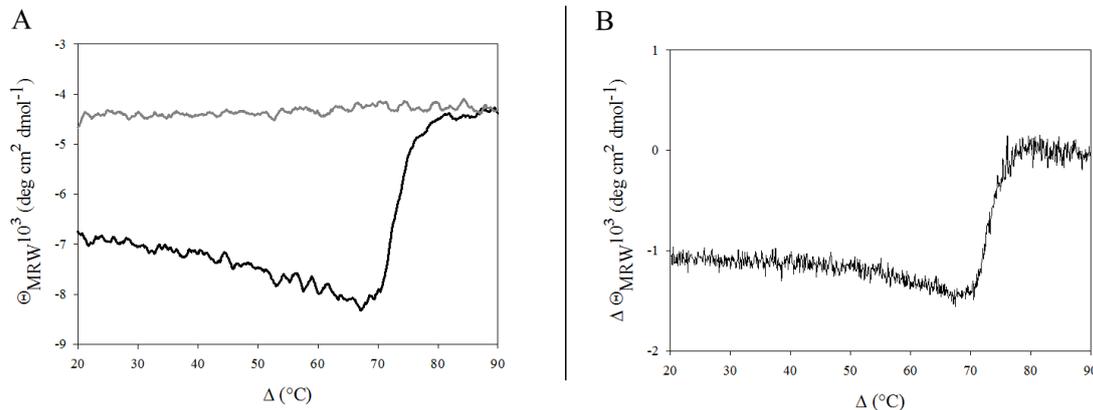


Abbildung 5.25: Temperaturübergang der Trypsiligasevariante 4 und der Trypsiligase. **A:** Temperaturübergang der Trypsiligasevariante 4. Bedingungen: 8 μM Trypsiligasevariante 4, 2 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM CaCl_2 , 80 μM ZnCl_2 , $\lambda = 208$ nm. Schwarz: Temperaturübergang von 20–90 $^\circ\text{C}$, Grau: Temperaturübergang von 90–20 $^\circ\text{C}$. **B:** Temperaturübergang der Trypsiligase (Daten wurden von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96]). Bedingungen: 5 μM Trypsiligase, 2 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM CaCl_2 , 50 μM ZnCl_2 , $\lambda = 208$ nm.

Bei dem Temperaturübergang der Trypsiligasevariante 4 (Abbildung 5.25 A) erhöhte sich die Intensität des CD-Signals bei steigender Temperatur von 20–70 $^\circ\text{C}$ von ungefähr -7000 $\text{deg cm}^2 \text{d mol}^{-1}$ auf -8000 $\text{deg cm}^2 \text{d mol}^{-1}$. Bei 70 $^\circ\text{C}$ erfolgte eine sprunghafte Verringerung der Signalintensität auf -4500 $\text{deg cm}^2 \text{d mol}^{-1}$, was einem Übergang der Trypsiligasevariante 4 von der nativen Struktur in einen entfalteten Zustand entspricht. Dieser Übergang war bei ca. 80 $^\circ\text{C}$ abgeschlossen. Der Temperaturübergang der Trypsiligase zeigt einen vergleichbaren Verlauf (Abbildung 5.25 B) [96]. Der inverse Temperaturübergang der Trypsiligasevariante 4 (Abbildung 5.25 A) von 90–20 $^\circ\text{C}$ hingegen zeigte ein konstantes Signal bei ca. -4500 $\text{deg cm}^2 \text{d mol}^{-1}$ (grauer Verlauf). Der native Zustand des Biokatalysators wird somit nach thermischer Denaturierung und Abkühlung unter den gewählten Bedingungen nicht wieder hergestellt.

Zur Untersuchung der pH-Wert-abhängigen Funktionalität des Enzyms wurden ebenfalls Hydrolysestudien des Peptidsubstrates Bz-AAYRHAG bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Korrespondierende initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v und relative Aktivitäten sind in Abbildung 5.26 A dargestellt. Vergleichende Daten für die Trypsiligase sind in Abbildung 5.26 B zur besseren Vergleichbarkeit dargestellt. Die Daten in Abbildung 5.26 B wurde freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96].

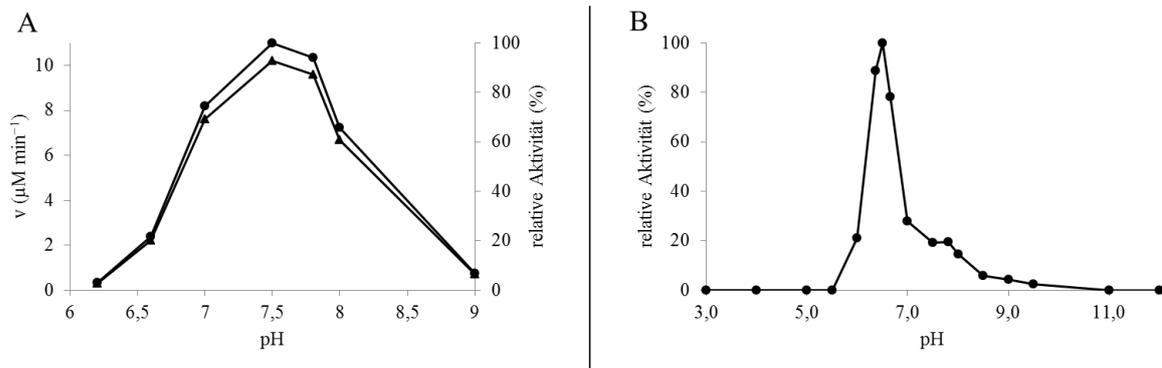


Abbildung 5.26: pH-Abhängigkeit der Peptidhydrolyse. **A:** pH-Abhängigkeit der proteolytischen Spaltung des Peptides Bz-AAYRHAG katalysiert durch die Trypsiligasevariante 4. \blacktriangle initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v ($\mu\text{M min}^{-1}$), \bullet relative Aktivitäten (%). Bedingungen: 1 mM Bz-AAYRHAG, 100 mM Bis-Tris-Propan pH 6,2–9,0, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 $\mu\text{M ZnCl}_2$, 10 μM Trypsiligasevariante 4, 30 °C. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen mit einem Fehler von < 5 %. **B:** Relative Aktivität der proteolytischen Spaltung des Modellpeptides Bz-AAYRHAAG durch die Trypsiligase bei ausgewählten pH-Werten (Daten wurden von Dr. Sandra Liebscher zur Verfügung gestellt [96]). Bedingungen: 1 mM Bz-AAYRHAAG, 20 μM Trypsiligase, 10 mM CaCl_2 , 100 $\mu\text{M ZnCl}_2$, 375 mM Puffer (MES bzw. Bis-Tris-Propan). Bz: Benzoyl.

Die Trypsiligasevariante 4 zeigte ein Optimum der katalytischen Aktivität bei pH 7,5 (Abbildung 5.26 A). Die initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v lagen bei pH 7,5 bei $10,2 \mu\text{M min}^{-1}$ (relative Aktivität: 100 %) und bei pH 7,8 bei $9,6 \mu\text{M min}^{-1}$ (relative Aktivität: 94,1 %). Bei pH 7,0 konnte nur noch eine initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit v von $7,6 \mu\text{M min}^{-1}$ (relative Aktivität: 74,5 %) ermittelt werden. Eine Erhöhung des pH-Wertes von pH 7,8 auf pH 8,0 bewirkte eine Reduzierung der initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit v von $9,6 \mu\text{M min}^{-1}$ auf $6,7 \mu\text{M min}^{-1}$. Bei einem pH-Wert von 6,2 bzw. 9,0 zeigte die Trypsiligasevariante 4 nur noch eine stark verminderte katalytische Aktivität mit initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeiten v von $0,3 \mu\text{M min}^{-1}$ (relative Aktivität: 2,9 %) bzw. $0,7 \mu\text{M min}^{-1}$ (relative Aktivität: 6,9 %). Die Trypsiligase zeigt in dem betrachteten pH-Bereich zwei Maxima der relativen Aktivität (Abbildung 5.26 B). Eines der Maxima liegt bei pH 6,6 und eines bei pH 7,8 [96].

5.5.4 C-terminale Modifizierung eines Fab-Fragmentes

Die C-terminale Modifizierung des anti-TNF α Fab-Fragmentes katalysiert durch die Trypsiligasevariante 4 erfolgte unter Verwendung des Nukleophils RHAK(CF) als Fluoreszenzsonde. Die Analyse der Reaktion zu ausgewählten Zeitpunkten erfolgte durch die Separation der Reaktanden mittels SDS-PAGE. Dazu wurden Reaktionsaliquote zu ausgewählten Zeitpunkten entnommen und die Reaktanden wurden mittels nicht-reduzierter SDS-PAGE anhand des Molekulargewichts getrennt (Abbildung 5.27 – die Experimente wurden freundlicherweise von Dr. Sandra Liebscher durchgeführt und die Ergebnisse zur Verfügung gestellt).

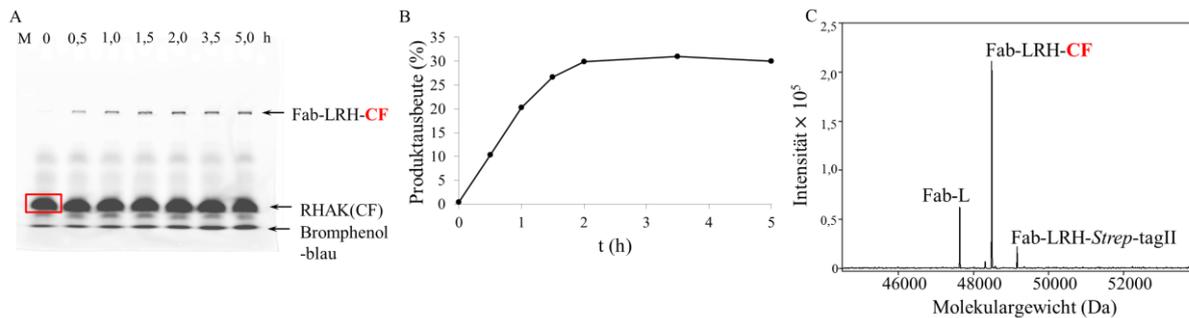


Abbildung 5.27: C-terminale Modifizierung des anti-TNF α Fab-Fragmentes mit RHAK(CF) als Fluoreszenzsonde. **A:** Nicht-reduzierte SDS-PAGE-Analyse von Reaktionsaliquoten zu ausgewählten Zeitpunkten, Coomassie-Färbung. M: Proteinstandard (*PageRuler™ prestained*). **B:** Zeit-Umsatz-Kurve der Produktbildung. Die Produktausbeuten wurden densitometrisch bestimmt. Die Konzentration an RHAK(CF) zum Zeitpunkt 0 h (rotes Kästchen) diente als Referenz. **C:** ESI-Massenspektrum des Reaktionsansatzes nach einer Reaktionszeit von 3,5 h. Fab-L – $M_{\text{ber.}}$: 47629 Da, $M_{\text{gef.}}$: 47629 \pm 1 Da. Fab-LRH-CF – $M_{\text{ber.}}$: 48480 Da, $M_{\text{gef.}}$: 48481 \pm 1 Da. Fab-LRH-Strep-tagII¹⁹ – $M_{\text{ber.}}$: 49162 Da, $M_{\text{gef.}}$: 49162 \pm 1 Da. Reaktionsbedingungen: 100 μ M Fab-LRH-Strep-tagII¹⁹, 500 μ M RHAK(CF), 100 μ M ZnCl₂, 20 μ M Trypsiligasevariante 4, 100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 30 °C. CF: Carboxyfluorescein.

Die distinkten Banden mit dem höchsten Molekulargewicht (obere Banden) in Abbildung 5.27 A repräsentieren das C-terminal modifizierte Fab-Fragment Fab-LRH-CF. Die erreichte Produktausbeute von 31 % unter den gewählten Reaktionsbedingungen (Abbildung 5.27 B) wurde densitometrisch nach Coomassie-Färbung, unter Berücksichtigung der Konzentration an RHAK(CF) zum Zeitpunkt 0 h als Referenz, bestimmt. Die Identitäten der Reaktanden wurden mittels Massenspektrometrie bestätigt (Abbildung 5.27 C). Der E-Wert der Reaktion betrug 9,0 (siehe Formel 1, Kapitel 5.5.2.3). Für eine Trypsiligase-katalysierte Reaktion unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen lag der E-Wert bei 1,5 [104].

6 Diskussion

6.1 Auswahl geeigneter Randomisierungsstellen innerhalb der Trypsiligase

Eine Anzahl von 5 Randomisierungsstellen wurde im Vorfeld festgelegt, da mittels *Phage Display* ca. $3,4 \times 10^7$ – $3,4 \times 10^{10}$ randomisierte Sequenzen selektiert werden können, was einer Anzahl von 5–7 Randomisierungsstellen n entspricht [162]. Eine Anzahl von n Randomisierungsstellen generiert dabei 32^n mögliche Codon-Kombinationen ($3,4 \times 10^7$ – $3,4 \times 10^{10}$) bei der Verwendung von NNK²²-Oligonukleotiden zur Randomisierung [162]. Limitierend auf die Bibliotheksgröße für ein *Phage Display* wirkt sich allgemein zum einen die Transformations-effizienz der Mikroorganismen und zum anderen die Durchsatzrate der Selektion bzw. des Screenings aus [162, 163]. Die Auswahl geeigneter Randomisierungsstellen erfolgte in Anlehnung an die Arbeitshypothese unter Betrachtung der Sortase A als Modellenzym. Die gewünschte verminderte Sekundärhydrolysegeschwindigkeit resultierender Trypsiligasevarianten sollte durch ein artifizielles hydrophobes Cluster im aktiven Zentrum der Trypsiligasevarianten realisiert werden (Kapitel 2). Zur Festlegung der Randomisierungsstellen wurden daher hydrophile Aminosäureseitenketten in einem Radius von 10–20 Ångström um das katalytisch aktive Serin 195 des anionischen Rattentrypsins ausgewählt, deren Austausch nicht bekanntermaßen zu einem Aktivitätsverlust des Biokatalysators führt (Abbildung 5.1). Die Auswahl der entsprechenden Aminosäureseitenketten erfolgte dabei anhand von Strukturanalysen.

Die Aminosäureseitenketten Ser61, Arg62 und Gln64 befinden sich im *loop 60* der S1'-Bindungsregion und sind an der Spezifität von Trypsin im S1'-Bindungsort ohne eine direkte Exposition zur Aminosäureseitenkette in P1'-Position beteiligt [101, 164]. Der Angriff des hydrolytisch aktiven Wassermoleküls zur Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates erfolgt von Seiten der Abgangsgruppe, demnach S1'-seitig [84], wobei eine vorgelagerte Deprotonierung des Wassermoleküls durch das His57 stattfindet [165]. Somit schien die Randomisierung von im S1'-Bindungsort lokalisierten Aminosäureseitenketten geeignet, den Ausschluss von hydrolytisch aktiven Wassermolekülen aus dem aktiven Zentrum zu realisieren. Die Aminosäureseitenketten Ser190 und Gln192 hingegen sind im S1-Bindungsort lokalisiert [98]. Es ist bekannt, dass die Aminosäuren an den Positionen 189–195 diesen auskleiden [166]. Die Aminosäureseitenkette Ser190 ist zudem an der Solventvermittelten Einbindung von Inhibitoren wie BPTI und Benzamidin oder auch an der Einbin-

²² N – ATGC, K – GT

dung der Lysinseitenkette eines Substrates für *wt*-Trypsin beteiligt. Zur Interaktion mit der ϵ -Aminofunktion der Lysinseitenkette steht dabei sowohl das Sauerstoffatom der Serinseitenkette als auch jenes des Peptidrückgrates zur Verfügung [166]. Das Ser190 schien somit aufgrund der Fähigkeit, Substrate bzw. Inhibitoren und Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken zu binden, zur Randomisierung geeignet [166–169]. Das Gln192 wird in der Literatur als flexible Aminosäureseitenkette beschrieben, die sich am Rand des Zugangs zum aktiven Zentrum befindet [166, 170]. Je nach Substratbindung konnten unterschiedliche Konformationen ermittelt werden. Es wird postuliert, dass diese Aminosäureseitenkette als eine Art Deckel über dem S1-Bindungsart befindet [166]. An der Einbindung der Aminosäureseitenkette in P1-Position eines Substrates in den S1-Bindungsart des Biokatalysators ist diese Aminosäureseitenkette, wie auch das Ser190, direkt beteiligt. Durch das Ausbilden einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carboxamidgruppe der Glutaminseitenkette und der Carboxylgruppe der Aminosäure in P1-Position wird diese im S1-Bindungsart fixiert [170]. Auch diese Aminosäureseitenkette wurde somit aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer Eigenschaften als Randomisierungsstelle ausgewählt.

6.2 Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA- und Proteinebene

Ein evolutiver Ansatz für die Optimierung von Biokatalysatoren über ein *Phage Display*-Projekt beinhaltet immer die Verwendung von *E. coli*-Zellen zur Darstellung der Bibliothek an Zielproteinen [130], was auf Proteinebene je nach Zielprotein detailliertere Betrachtungen notwendig macht. Im Falle der Trypsiligase, welche über 6 Disulfidbrückenbindungen verfügt, stellt die Notwendigkeit der korrekten Faltung und Ausbildung der Disulfidbrückenbindungen eine Herausforderung dar, da das Enzym andernfalls katalytisch nahezu inaktiv ist [171]. Aufgrund der hohen Anzahl an Disulfidbrückenbindungen werden die Trypsiligase und somit auch weitere Trypsiligasevarianten meist in eukaryotischen Zellsystemen exprimiert, da sich hier die native Konformation in den Zellkompartimenten mit oxidierendem Milieu ausbilden kann [172]. Eine Expression der Trypsiligase sowie weiterer Trypsiligasevarianten in *S. cerevisiae* als Fusion mit einem α -factor-leader unter Verwendung des pYT-Plasmides hat sich hierbei etabliert [173]. Eine Expression aktiver Trypsiligasevarianten in *E. coli* ist aufgrund eines reduzierenden Milieus im Cytoplasma [174] nur durch die Sekretion in das Periplasma möglich, welches ein oxidierendes Milieu aufweist [175]. Realisiert werden kann eine periplasmatische Expression durch Fusionierung des Zielproteins mit der *pelB* leader-Sequenz [176], welche eine Translokation der Proteine über den *Sec-Pathway* in das Periplasma zur Folge hat [177]. Die gleiche Signalsequenz gewährleistet auch im Rahmen von *Phage Display*-Projekten die Sekretion der Fusionskonstrukte aus Zielprotein und C-

terminaler Domäne des pIII-Proteins in das Periplasma [178, 179]. Die *pelB leader*-Sequenz wurde ebenfalls im Rahmen der Optimierungsstudie der Trypsinmutante H57A mittels *Phage Display* verwendet [149]. Für die Sekretion des Fusionskonstruktes aus Trypsiligasevariante und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins in das Periplasma wurde somit auch im Rahmen dieser Arbeit die *pelB leader*-Sequenz für das *Phage Display* verwendet. Eine Abspaltung der Signalsequenz durch entsprechende Signalpeptidasen [180] realisiert nach der Translokation in das Periplasma die Ausbildung des freien N-Terminus, welcher für die Ausbildung der nativen Konformation der Trypsiligasevarianten essentiell ist [173].

Im Rahmen der Generierung der Bibliotheken an Trypsiligasevarianten sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene galt es somit zunächst, eine geeignete Zelllinie zu finden, welche die Expression katalytisch aktiver Trypsiligasevarianten und deren Präsentation auf der Oberfläche filamentöser Phagen ermöglicht. Zur Wahl standen *E. coli TGI*- und *E. coli XII blue*-Zellen, welche häufig für *Phage Display*-Projekte eingesetzt werden [130]. Insbesondere wurden die *E. coli TGI*-Zellen für die bereits angesprochene Optimierungsstudie der Trypsinmutante H57A verwendet [149]. Generelle Voraussetzung für die Eignung einer Zelllinie ist die Verfügbarkeit einer Amber-Suppressor-tRNA sowie das Vorhandensein des Fertilitätsfaktors F'. Die Infektion der *E. coli*-Zellen durch Bakteriophagen verläuft über die bakteriellen Pilistrukturen [130]. Daher ist die Verwendung von *E. coli*-Zellen mit F'-Episom (Fertilitätsfaktor F') eine Voraussetzung, da dieses zur Ausbildung der Pilistrukturen befähigt [181]. Die Amber-Suppressor-tRNA ist für die Überlesung des im Phagemid vorhandenen Amber-Stop-Codons (TAG) notwendig, ohne die eine Expression der Fusionskonstrukte aus Trypsiligasevariante und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins auf zellulärer Ebene nicht möglich ist [182]. Im Rahmen der Phagenassemblierung wird das Fusionskonstrukt aus Trypsiligasevariante und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins in den Phagen eingebaut und so die Trypsiligasevariante auf der Oberfläche präsentiert [130]. Fehlt die C-terminale Domäne des pIII-Proteins, kann die Trypsiligasevariante folglich nicht auf der Oberfläche des rekombinanten Phagen präsentiert werden. Kommerziell erhältliche Phagemide weisen oft ein Amber-Stop-Codon (TAG) *downstream* der DNA-Sequenz für das Zielprotein auf, da durch Transformation des Phagemids in eine *E. coli*-Zelllinie ohne entsprechende Amber-Suppressor-tRNA das Zielprotein ohne pIII-Fusion direkt exprimiert werden kann [130]. Zusätzlich wird so der Gehalt an toxischem Fusionskonstrukt aus Zielprotein und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins gering gehalten [132, 183]. Bedingung für eine geeignete Zelllinie ist folglich die Expression des Fusionskonstruktes aus Zielprotein und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins auf zellulärer Ebene, was anhand der Trypsiligase als Vorläufer der Trypsi-

ligasevarianten untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass nur die *E. coli XII blue*-Zellen in der Lage sind, das Amber-Stop-Codon (TAG) in detektierbaren Mengen zu supprimieren (Abbildung 5.3). Die simultane Expression der Trypsiligase ohne C-terminale pIII-Fusion resultiert hierbei aus einer unvollständigen Suppression des Amber-Stop-Codons (TAG) [182, 184]. Die Suppression des Amber-Stop-Codons (TAG) erfolgt nur zu 26–65 % [182, 184], wobei unter Verwendung der *E. coli XII blue*-Zellen im Rahmen der Proteinbiosynthese an Stelle des Amber-Stop-Codons (TAG) ein Glutamin eingebaut wird [185]. Die *E. coli XII blue*-Zellen stellten sich somit als geeignet heraus und wurden für das *Phage Display*-Projekt verwendet. Die zuvor klonierte Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf Vektorebene²³ wurde daher in die ausgewählten *E. coli XII blue*-Zellen transformiert. So wurde die Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene mit 5 % der theoretischen Bibliotheksgröße von $3,4 \times 10^7$ Varianten quantitativ generiert (Kapitel 5.3 und Kapitel 4.1.2). Qualitativ konnte nur bei 1 % der Klone ein offener Leserahmen für eine Trypsiligasevariante mit C-terminaler Domäne des pIII-Proteins im enthaltenen Phagemid mittels Sangersequenzierung bestätigt werden. Unter Verwendung von NNK²²-Oligonukleotiden zur Bibliotheksklonierung kann eine vollständige Abdeckung der theoretischen Bibliotheksgröße jedoch prinzipiell erreicht werden [186]. Zur Etablierung des *Phage Display*-Verfahrens für die Optimierung der Trypsiligase wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit auf die Durchführung aufwendiger Optimierungsschritte zur Bibliotheksklonierung verzichtet. Die Diskrepanz von 4 % zwischen quantitativ erhaltener und qualitativ bestätigter Bibliotheksgröße wurde dennoch näher betrachtet. Dazu wurden die randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten vor Ligation in den mpSCIL mittels Sangersequenzierung überprüft. Anhand der Fluoreszenzprofile dieser Sangersequenzierungen konnte gezeigt werden, dass die Randomisierung der ausgewählten Stellen erfolgreich war und dass keine Mutationsereignisse in den flankierenden Positionen auftraten (Abbildung 5.6). Sowohl die flankierenden als auch die internen nicht randomisierten Basentriplets sind in ihrer ursprünglichen Sequenz erhalten, ohne dass Baseninsertionen, -deletionen oder Punktmutationen aufgetreten sind. Erkennbar ist dies anhand der guten Qualität des Fluoreszenzsignals und durch das Fehlen überlagerter Signale. Die Funktionalität der verwendeten NNK²²-Oligonukleotide konnte hier ebenfalls bestätigt werden. NNK²² bedeutet, dass an jeder „N-Position“ des Basentriplets der Einbau einer der vier möglichen Basen (A, T, C, G) und an jeder „K-Position“ der Einbau einer von zwei möglichen Basen (G, T) erfolgt, was sich in der Überlagerung der vier möglichen Fluoreszenzsignale an den „N-Positionen“ und einer Überlagerung von zwei Fluoreszenzsignalen an den

²³ Randomisierte Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten ligiert in den mpSCIL

„K-Positionen“ widerspiegelt. Außerhalb der Randomisierungsstellen konnten ebenfalls keine Mutationsereignisse in den DNA-Sequenzen detektiert werden (Abbildung 5.7). Der Sequenzvergleich mit der Trypsiligase bestätigte die Identität dieser DNA-Bereiche mit einer Übereinstimmung der Sequenzen von 100 % für nicht randomisierte Bereiche. Randomisierte Bereiche hingegen wiesen eine Übereinstimmung der Sequenzen von 0 % auf, was die erfolgreiche Randomisierung zusätzlich verdeutlichte. Unter Betrachtung der hier diskutierten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die für die Ligation in den Phagemid mpSCIL eingesetzten randomisierten Gensyntheseprodukte eine hohe Qualität aufwiesen. Die Reduzierung der erhaltenen Bibliotheksgröße auf 1 % des theoretisch möglichen Wertes durch nachfolgende Arbeitsschritte zur Insertion der Bibliothek auf Vektorebene in die *E. coli* *XII blue*-Zellen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Korrespondierende Diskussionspunkte werden unter Kapitel 6.3 aufgegriffen.

Nachteilig bei der hier verwendeten NNK²²-Technologie zur Bibliotheksgenerierung wirkt sich generell das Vorhandensein funktional gleicher Basentriplets aus, was nach der Translation zu einer Überpräsentation einiger Aminosäuren führen kann [187, 188]. Zur Vermeidung dieser Ungleichverteilung an Aminosäuren bietet neben der Generierung synthetischer DNA-Fragmente die MAX-Technologie einen generellen Ansatzpunkt, wobei die Anzahl der verschiedenen Gene gleich der Anzahl der daraus resultierenden Proteine ist [187]. Die Zielsequenz wird hier zunächst durch NNN²⁴-Oligonukleotide randomisiert. Definierte MAX-Selektionsprimer (20 für jedes Basentriplett) werden dann mit dem randomisierten Ursprungsfragment hybridisiert und die einzelnen MAX-Primer werden im Anschluss zu einem zusammenhängenden DNA-Fragment ligiert und amplifiziert [187]. Nachteilig wirkt sich hier jedoch die Anzahl benötigter „Selektionsprimer“ aus, da für jedes randomisierte Basentriplett 20 solcher Primer benötigt werden (100 Primer bei 5 Randomisierungsstellen) [109].

Im Zuge der Generierung einer Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf Proteinebene wurde die Präsentation katalytisch aktiver Trypsiligasevarianten auf der Oberfläche rekombinanter Phagen untersucht. Hierbei stand die Erkennung und proteolytische Spaltung der YRH-Erkennungssequenz im Fokus, die auch für die Selektion eingesetzt werden sollte. Verifiziert wurde die proteolytische Spaltung der YRH-Erkennungssequenz anhand der Trypsiligase, die auf der Oberfläche rekombinanter Phagen präsentiert wurde (Abbildung 5.4). Der experimentelle Aufbau erfolgte in Anlehnung an den bereits für Phagen-präsentiertes *wt*-Trypsin beschriebenen [148]. Es konnte eine lineare Abhängigkeit der Bildung des Hydrolyseproduktes

²⁴ N – ATGC

Bz-AAAY mit der Reaktionszeit beobachtet werden, was die Erkennung und proteolytische Spaltung der Erkennungssequenz bestätigte. Bei Betrachtung der initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit von $2,8 \mu\text{M h}^{-1}$ muss man bedenken, dass die Reaktion langsam erfolgt, da die Hydrolysegeschwindigkeit der Trypsiligase im Vergleich zum *wt*-Trypsin deutlich reduziert ist [97]. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Konzentration an Trypsiligase im Reaktionsansatz – basierend auf den eingesetzten 10^8 rekombinanten Phagen – im picomolaren Bereich lag. Zur Verifizierung einer Produktbildung katalysiert durch die Phagenpräsentierte Trypsiligase wurde der gleiche Reaktionsansatz unter Verwendung von Helferphagen durchgeführt. Diese präsentieren keine Trypsiligase auf ihrer Oberfläche und es konnte entsprechend auch keine Bildung des Hydrolyseproduktes Bz-AAAY detektiert werden. Die Bestätigung, dass auf einem Phagen präsentierte Trypsiligase in der Lage ist, die proteolytische Spaltung der YRH-Sequenz zu katalysieren, war eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung der geplanten Selektionsmethode.

6.3 Selektionsmethode

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und etablierte Selektionsmethode sollte eine direkte Auswahl von Trypsiligasevarianten über den Substratumsatz ermöglichen, wobei parallel auf eine generell verminderte Peptidhydrolysegeschwindigkeit bezogen auf den Substratumsatz selektiert werden sollte.

Der Literatur zufolge wurden im Rahmen des *Enzyme Engineerings* mittels *Phage Display* zunächst Selektionsmethoden unter Verwendung von Übergangszustands-Analoga oder Selbstmordsubstraten etabliert [127, 146], um eine Auswahl über einen Substratumsatz zu ermöglichen. Probleme bezüglich der Korrelation von verantwortlichen Biokatalysatoren mit den detektierten Reaktionen wurden so überwunden, da die Diffusion der Reaktanden ausbleibt [149]. Beispielsweise konnte durch die Verwendung von biotinylierten Selbstmordsubstraten die Akzeptanz einer Subtilisin-Variante (Savinase) für Substrate mit basischen Aminosäureseitenketten in P4-Position erreicht werden [189]. Die Selektion von Enzymen mit β -Lactamase-Eigenschaften sowie mit Eigenschaften Penicillin-bindender Proteine aus einer Bibliothek randomisierter TEM-1- β -Lactamase gelang ebenfalls durch die Verwendung biotinylierter Selbstmordsubstrate [190]. Durch die Verwendung von Übergangszustands-Analoga gelang die Isolierung von humanen Glutathion-Transferase-Mutanten mit neuartigen Bindungsspezifitäten im aktiven Zentrum [191]. Die Analyse identifizierter Enzymvarianten erfolgt hierbei meist nach Elution der Enzyme durch eine spezifische proteolytische Spaltung der Verbindung zwischen Enzym und pIII-Protein [127]. Die Selektionsmethoden beruhen

jedoch auch hier mehr auf einer Affinitätsselektion über Bindungsstudien, wie dies auch bei klassischen *Panning*-Studien der Fall ist (Kapitel 1.3), als auf einer katalytischen Aktivität mit vollständigem Substratumsatz [132]. Die direkte Auswahl von angepassten bzw. optimierten Biokatalysatoren über einen vollständigen Substratumsatz stellt die Etablierung geeigneter Selektionsmethoden somit vor neue Herausforderungen. Probleme ergeben sich hier ebenfalls in der Diffusion von Reaktionsprodukten, was eine Detektion katalytisch aktiver, Phagen-präsentierter Biokatalysatoren erschwert [149]. Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, die eine direkte Zuordnung der entstehenden Reaktionsprodukte zu dem korrespondierenden Biokatalysator ermöglichen. Die Verwendung immobilisierter „*Trapping*-Substrate“ [186, 192, 193], eine Immobilisierung von Substraten auf der Phagenoberfläche durch ein Cystein-vermitteltes *Crosslinking* saurer und basischer *coiled coil*-Peptide [194], eine Affinitätschromatographie in Kombination mit katalytischer Elution [195] sowie Calmodulin-basierte Ansätze [196] sind ausgewählte Beispiele für bereits etablierte Methoden, um die Diffusion von Reaktionsprodukten zu umgehen. Diese Methoden ermöglichen jedoch ausschließlich eine Selektion von Enzymen, die die gewünschte Reaktion katalysieren. Eine kombinierte Selektion hinsichtlich der gewünschten Reaktion und zusätzlicher Eigenschaften ist dagegen nur schwer möglich. Diese Methoden waren daher für unser Ziel ungeeignet. Enzyme mit einem ähnlichen Katalysemechanismus wie die Trypsinase, sind die Sortase A und die Subtiligase, die ebenfalls mittels *Phage Display* und einer geeigneten Selektionsmethode optimiert wurden. Dabei gelang es, eine Variante der Subtiligase mit gesteigerter Aktivität zu erhalten, wobei hier der Biokatalysator selbst einen Reaktionspartner darstellte [131]. Der Katalysemechanismus der Subtiligase ermöglicht Ligationen biotinylierter Peptide an den *N*-Terminus der Subtiligase. Dies hat eine direkte Verlinkung des Reaktionsproduktes mit dem Biokatalysator zur Folge, der die Reaktion katalysiert hat. Der biotinylierte Komplex aus Subtiligase und Phage wurde nachfolgend mit einer immobilisierten Avidin-Variante (NeutrAvidin[®]) angereichert. Aus einem Pool von 4×10^9 Varianten konnten zwei Biokatalysatoren mit einer 2,5- bis 2,7-fach erhöhten Aktivität für die Peptidligation – verglichen mit der *wt*-Subtiligase – erhalten werden [131]. Eine ähnliche Methode wurde verwendet, um Sortase A-Varianten mit erweiterter Substratspezifität hinsichtlich der LPXTG-Erkennungssequenz zu selektieren. Auch hier wurde die auf dem Phagen präsentierte Sortase A über den bereits beschriebenen Katalysemechanismus (Kapitel 1.2.3) *N*-terminal durch Zugabe eines geeigneten Substrates mit veränderter Erkennungssequenz biotinyliert, was eine anschließende Immobilisierung der gewünschten Sortase A-Varianten über Streptavidin ermöglichte [197]. Diese Art der Immobilisierung ist jedoch für die Optimierung der Trypsili-

gase ebenfalls nicht geeignet, da hier ein freier *N*-Terminus des Enzyms für die katalytische Aktivität essentiell ist [173].

Im Rahmen dieser Arbeit galt es daher, eine neuartige Selektionsmethode zu etablieren, die die Identifizierung von Trypsiligasevarianten mit den gewünschten Eigenschaften ermöglicht. Identifizierte Trypsiligasevarianten sollten eine Trypsiligase-ähnliche Aktivität mit reduzierter Sekundärhydrolyseaktivität zeigen, was zu stabileren Reaktionsprodukten bei Transamidierungsreaktionen führt (siehe Abbildung 1.4 und Kapitel 2). Vor der eigentlichen Entwicklung, Optimierung und Etablierung der Selektionsmethode galt es jedoch zunächst, geeignete Selektionsbedingungen zu finden. Trypsiligase benötigt, wie auch *wt*-Trypsin, Calciumionen als Cofaktor. Zusätzlich werden für die gezeigte Komplexierung der Histidine im S2'-Bindungsort mit dem P2'-Histidin geeigneter Substrate Zinkionen benötigt (Kapitel 1.2.3.1.1). Filamentöse Phagen zeigen jedoch in Anwesenheit zweiwertiger Metallionen eine Fibrillenbildung [158], die auf einer lateralen Aggregation der Phagen mit negativer Oberflächenladung, induziert durch Gegenionen, beruht [198]. Somit mussten Bedingungen gefunden werden, unter denen die Trypsiligasevarianten noch aktiv sind, aber keine Fibrillenbildung induziert wird. Anhand der gezeigten Ergebnisse der Streulichtmessungen (Kapitel 5.4.1) und einer direkten Korrelation der Streulichtintensität mit dem Grad der Fibrillenbildung [158] wurde 50 mM Tris/HCl bei pH 7,5 mit 250 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ und 25 μM ZnCl₂ als Standardpuffer für die Selektionsmethode festgelegt, da bei dem Zusatz von bis zu 25 μM ZnCl₂ und 5 mM CaCl₂ keine Fibrillenbildung detektiert werden konnte. Die Konzentration an Calcium- bzw. Zinkionen ist zudem ausreichend, um Bindungsstellen der Trypsiligasevarianten während der Selektion zu sättigen, da mit Enzymkonzentrationen im nanomolaren Bereich gearbeitet wurde.

Die Eignung der verwendeten Peptide Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG und RHAADapAbz als Substrate für die Selektionsmethode unter den beschriebenen Pufferbedingungen konnte im Vorfeld ebenso bestätigt werden (Abbildung 5.9) wie die Zugänglichkeit des immobilisierten Peptides Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG für die Trypsiligasevarianten (Abbildung 5.10). Die Zugänglichkeit des immobilisierten Peptides wurde exemplarisch anhand der Immobilisierung des Peptides an Streptavidin-*beads* gezeigt.

Eine Selektionsmethode wurde in Anlehnung an das gestellte Ziel zunächst theoretisch entwickelt. Im Rahmen einer Optimierungsstudie wurden dann Anpassungen der Selektionsmethode vorgenommen, die auf den jeweiligen Erkenntnissen der praktischen Durchführungen beruhten. Dabei wurden jedoch nur Parameter der eigentlichen Durchführung angepasst und

optimiert, welche später diskutiert werden. Somit wurden im Rahmen dieser Optimierungsstudie verschiedene Selektionsverfahren entwickelt und praktisch durchgeführt. Die Selektionsmethode als solche – das Grundgerüst – blieb dabei unverändert. Am Ende konnte ein Selektionsverfahren etabliert werden, mit dem es final sogar gelang, einen optimierten Biokatalysator im Rahmen dieser Arbeit zu identifizieren. Die erfolgreiche Etablierung der Selektionsmethode über das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat als Selektionsstruktur wurde somit ebenfalls bestätigt.

Unter Verwendung der Selektionsmethode galt es nach der Randomisierung der gewählten Mutationsstellen (siehe Kapitel 5.1 und Kapitel 6.1), Trypsiligasevarianten mit einer generell verminderten Peptidhydrolysegeschwindigkeit zu identifizieren. Eine generell verminderte Peptidhydrolysegeschwindigkeit sollte eine reduzierte Sekundärhydrolysegeschwindigkeit bedingen, da die Sekundärhydrolyse nach dem gleichen Reaktionsmechanismus abläuft und währenddessen ein strukturell identisches kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat gebildet wird. Die hier etablierte Selektionsmethode beruht auf einem Immobilisierungs- und Elutionsassay und unterscheidet sich damit – nach bestem Wissen – von den bereits etablierten und zuvor diskutierten (Literaturbeispiele wurden bereits genannt). Besonderheit dieser Selektionsmethode (siehe Abbildung 5.11 und Abbildung 5.13) ist eine Verknüpfung von drei Selektionsstufen mit der katalytischen Aktivität der Trypsiligasevarianten, wobei das allgemeine Schema einer Transamidierung Anwendung findet (Abbildung 1.4):

1. Die Erkennung und die proteolytische Spaltung der spezifischen YRH-Sequenz durch die Trypsiligasevarianten in Gegenwart von Zinkionen resultiert in der Ausbildung der kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate.
2. Eine verminderte Peptidhydrolysegeschwindigkeit führt zu einer zeitlich begrenzten Retention der Trypsiligasevarianten im immobilisierten Zustand. Die Immobilisierung der Trypsiligasevarianten, welche für die Ausbildung der kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate verantwortlich sind, erfolgt dabei parallel mit den korrespondierenden rekombinanten Phagen durch die kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate als solche. Voraussetzung sind hydrolyseunanfällige kovalente Acyl-Enzym-Intermediate, die durch die Eliminierung von inaktiven Trypsiligasevarianten, unspezifischen Bindungspartnern und durch die Eliminierung von Trypsiligasevarianten mit einer hohen Hydrolysegeschwindigkeit selektiert werden. Dazu werden solange Waschschrte durchgeführt, bis sich idealerweise keine rekombinanten Phagen mehr im Überstand befinden.

3. Eine detektierbare Aminolyseaktivität der Trypsiligasevarianten resultiert in der Deacylierung der kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate durch die Katalyse einer Peptidligation. In diesem Schritt erfolgt der nukleophile Angriff des peptidischen Substrates RHAADapAbz an die kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate, was zu einer Deacylierung der Trypsiligasevarianten führt. Das Substrat RHAADapAbz wird dabei im aktiven Zentrum in Gegenwart von Zinkionen gebunden. Durch die Deacylierung der Biokatalysatoren werden die rekombinanten Phagen eluiert und folglich im Überstand zugänglich. Eine Elution der rekombinanten Phagen durch die Aminolyseaktivität korrespondierender Trypsiligasevarianten äußert sich in einer vermehrten Anzahl rekombinanter Phagen im Überstand nach der Elution im Verhältnis zur Anzahl rekombinanter Phagen im Überstand nach dem letzten Waschschrift. Nach der Freisetzung der rekombinanten Phagen in den Überstand und deren Titration mittels *E. coli* XII blue-Zellen (Kapitel 4.2.2) kann der korrespondierende Phagemid einer Sangersequenzierung unterzogen werden. Durch eine direkte Verbindung des Geno- und Phänotyps der Trypsiligasevarianten, welche durch den Phagen realisiert wird [130], ist somit eine Analyse der Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene möglich.

Diese Selektionsmethode beruht somit als weitere Besonderheit auf den reaktiven kovalenten Acyl-Enzym-Intermediaten, die den Dreh- und Angelpunkt darstellen. Diese Reaktionspartner sind nativ nicht stabil und reagieren direkt mit geeigneten Substraten (z. B. Wassermolekülen), was in einer Deacylierung des Biokatalysators resultiert. Zur Einschätzung der zeitlichen Stabilität eines solchen kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates wurde die katalytische Konstante k_{cat} von *wt*-Trypsin für das Substrat Z-GPR-AMC²⁵ herangezogen. Diese liegt bei $3050 \pm 200 \text{ min}^{-1}$ [135]. Dies bedeutet, dass jedes aktive Zentrum in einer Minute ungefähr 3050 Reaktionsprozesse katalysiert [2]. Näherungsweise kann somit davon ausgegangen werden, dass das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat für $\leq 0,02$ Sekunden stabil ist. Besonders im 2. Schritt der Selektion (siehe oben) sollte eine mögliche Reaktion der kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate mit Wassermolekülen und die damit einhergehende Deacylierung der Trypsiligasevarianten die Selektion über die kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate als Selektionsstrukturen theoretisch erschweren. In diesem Schritt erfolgt die Selektion auf stabile, hydrolyseunanfällige kovalente Acyl-Enzym-Intermediate in wässrigem Medium, was eine schnelle Deacylierung der Trypsiligasevarianten durch Wassermoleküle sehr wahrscheinlich erscheinen lässt. Die Deacylierung der Trypsiligasevarianten in diesem Schritt hätte eine Freisetzung

²⁵ Z: Benzyloxycarbonyl; AMC: Aminomethylcoumarin

der rekombinanten Phagen in den Überstand und somit ein Entfernen der korrespondierenden Trypsiligasevarianten aus der Selektion zur Folge. Bei der theoretischen Entwicklung der Selektionsmethode über das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat als Selektionsstruktur gab es daher Zweifel an der Umsetzbarkeit einer solchen Selektionsmethode. Trotzdem ist es eindrucksvoll gelungen, dieses katalytische Intermediat als Zielstruktur der Selektionsmethode zu etablieren.

Die Selektion hydrolyseunanfälliger kovalenter Acyl-Enzym-Intermediate erfolgte wie bereits erwähnt mittels multipler Waschschriffe. Praktisches Ziel der Selektionsmethode war daher eine möglichst geringe Anzahl an Trypsiligasevarianten im Überstand nach dem letzten Waschschriffe und eine höhere Anzahl an Trypsiligasevarianten im Überstand nach Elution durch Zugabe des Nukleophils. Die so eluierten Trypsiligasevarianten sollten die gewünschte Eigenschaft einer verminderten Peptidhydrolysegeschwindigkeit aufweisen. Die Stringenz innerhalb der Selektionsmethode wurde durch die Anzahl der Waschschriffe sowie durch die Inkubationsdauer der ausgebildeten kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate in wässriger Lösung von Selektionsrunde zu Selektionsrunde bzw. innerhalb einer Selektionsrunde erhöht (genaue Bedingungen siehe Kapitel 4.4). Eine Selektion von Trypsiligasevarianten, welche allgemein eine geringere katalytische Aktivität aufweisen als die Trypsiligase, ist in diesem Schritt nicht auszuschließen, da auch diese Trypsiligasevarianten eine reduzierte Peptidhydrolysegeschwindigkeit im Selektionsverfahren aufweisen. Die Möglichkeit während einer Selektion katalytisch inaktivere Biokatalysatoren zu identifizieren, ist in der Literatur ebenfalls beschrieben [131].

Im Verlauf der Optimierungsstudie der Selektionsmethode fand zunächst ein Selektionsverfahren mit Streptavidin-Platten als Trägermaterial und 3 Selektionsrunden Anwendung. Als Ergebnis dieses Selektionsverfahrens konnten von 10 analysierten Klonen zwei funktionale Trypsiligasevarianten identifiziert werden (Trypsiligasevariante 1 und 2). Die Identifizierung der Trypsiligasevarianten erfolgte auf DNA-Ebene mittels Sangersequenzierungen der in den Klonen enthaltenen Phagemide. Die übrigen 8 Klone enthielten Baseninsertionen bzw. -deletionen in den sequenzierten Genabschnitten. Die Trypsiligasebibliothek auf DNA-Ebene als solche kann jedoch – wie bereits diskutiert – als alleinige Ursache für die DNA-Sequenzen mit *frameshift*-Mutationen ausgeschlossen werden. Begründet liegen die auftretenden Mutationsereignisse vermutlich in der verwendeten Zelllinie in Kombination mit dem verwendeten Phagemid bzw. dessen Promotor. Wurde ein durch Sangersequenzierung bestätigter Phagemid mit inserierter Sequenz für Trypsiligase in *E. coli* XII blue-Zellen transformiert und ein Klon

der Selektionsplatte für die Phagenamplifizierung eingesetzt, traten nach Titration der erhaltenen rekombinanten Phagen zwei Spezies an Phagemiden auf – Vektoren mit offenen Leserahmen und solche mit *frameshift*- bzw. Punktmutationen. Eine daraus resultierende Abnahme der Funktionalität der eingesetzten rekombinanten Phagen in den jeweiligen Runden dieses Selektionsverfahrens konnte in einem ELISA-Experiment bestätigt werden (Abbildung 5.12). Einzig die rekombinanten Phagen, welche direkt aus der Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf DNA-Ebene amplifiziert wurden, wiesen eine detektierbare Funktionalität auf. Rekombinante Phagen, welche nach der ersten Runde des Selektionsverfahrens amplifiziert und für die zweite Runde eingesetzt wurden, zeigten keine detektierbare Funktionalität mehr. Das Auftreten von *frameshift*-Mutationen bzw. das Auftreten von Stopcodonen in den DNA-Sequenzen codierend für die Zielstrukturen im Rahmen von *Phage Display*-Projekten ist in der Literatur weit verbreitet, jedoch sind die Ursachen nicht hinreichend geklärt [199–201]. Als mögliche Ursache wird unter anderem eine Verringerung des Expressionslevels an zytoxischem Fusionskonstrukt aus Zielprotein und pIII-Protein genannt [131, 132, 183], was zu einer genetischen Instabilität des verwendeten Vektorsystems führt [202, 203]. Diese „*escape*“-Mutanten entstehen durch die Fähigkeit von *E. coli*-Zellen Selektionsdrücke zu umgehen, um die Vitalität der Kultur zu wahren [204, 205]. Eine möglichst geringe Konzentration an pIII-Fusionsprotein innerhalb der *E. coli*-Zellen im Zuge der bakteriellen Translation wurde im Rahmen dieser Arbeit unter anderem durch die Verwendung des mpSCIL Phagemids realisiert. Der mpSCIL ist ein *low copy*-Phagemid mit einem pBR322-Replikationsursprung [206]. Ein basales Niveau an Expression kann aber durch die Verwendung des *leaky-tac*-Promotors [132, 208] in dem verwendeten Phagemid selbst unter Zugabe von Glukose zur Repression nicht gänzlich verhindert werden [209]. Des Weiteren handelt es sich bei der Amber-Suppressor-tRNA supE44 um eine schwache Amber-Suppressor-tRNA [182, 207]. Das Amber-Stop-Codon, das die DNA-Sequenz zwischen Trypsiligasevariante und C-terminaler Domäne des pIII-Proteins unterbricht, wird hier – wie bereits erwähnt – nur zu 26–65 % [182, 184] supprimiert. Die Konzentration an pIII-Fusionsprotein wird somit innerhalb der *E. coli Xll blue*-Zellen zusätzlich gering gehalten. Als weiterer Grund für die genetische Instabilität des verwendeten Vektorsystems werden chemische Modifizierungen verwendeter synthetischer Oligonukleotide erwähnt, welche ebenfalls zu Baseninsertionen, -deletionen oder Punktmutationen im Rahmen des *Phage Display*-Projektes führen können [210]. Durch Mechanismen wie dem *RNA-Splicing*, bedingt durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen in der mRNA, können aber auch Genprodukte mutierter DNA-Sequenzen funktional auf der Oberfläche von rekombinanten Phagen präsentiert werden [211]. Eine wei-

tere Möglichkeit ein funktionales Genprodukt aus einer DNA-Sequenz ohne offenen Leserahmen zu erhalten, bietet das Ribosomen-*Slipping* [200, 210]. Daher ist eine gezielte Selektion solcher Enzymvarianten nicht gänzlich ausgeschlossen. Die Primärstrukturen dieser Enzymvarianten können jedoch nicht mehr rekonstruiert werden, weshalb diese Ergebnisse für die Identifizierung optimierter Enzyme nicht zielführend sind.

Als erster Optimierungsschritt zur Etablierung einer Selektionsmethode für optimierte Trypsiligasevarianten wurde daher auf die Durchführung mehrerer Selektionsrunden verzichtet, da eine Reduzierung der Anzahl funktionaler rekombinanter Phagen nach der ersten Selektionsrunde bestätigt wurde.

Ursächlich für die in Tabelle 5.1 gezeigte hohe Anzahl an Klonen sowohl nach dem Waschs als auch nach dem Elutionsschritt können unspezifische Bindungen der rekombinanten Phagen mit der Polystyroloberfläche der 96-*well*-Platte sein. Die Etablierung eines Selektionsverfahrens in Lösung unter Verwendung von Streptavidin-*beads* als weiterführende Optimierungsstufe diente einer Minimierung derartiger unspezifischer Interaktionen. Weiterführend wurde zusätzlich eine Nachselektion der erhaltenen Klone aus Tabelle 5.2 durchgeführt. Für diese Nachselektion wurde die Korrelation aus Generationszeit und Gehalt der Phagemid-DNA an *frameshift*-Mutationsereignissen genutzt, welche ebenfalls in der Literatur beschrieben ist [131]. *E. coli XII blue*-Zellen, die einen durch Sangersequenzierung bestätigten Phagemid mit offenem Leserahmen trugen, wiesen eine um einen Faktor 4,8 erhöhte Generationszeit auf als *E. coli XII blue*-Zellen, die einen Phagemid ohne offenen Leserahmen trugen. Nach Analyse aller Klone aus Tabelle 5.2 auf eine hinreichend lange Generationszeit konnte die Trypsiligasevariante 3 mittels Sangersequenzierung der Phagemid-DNA identifiziert werden. An dieser Stelle war ein weiterer Optimierungsschritt zur Etablierung der Selektionsmethode unvermeidbar, da die Anzahl an Klonen mit einem offenen Leserahmen innerhalb der Phagemid-DNA weiterhin nicht zufriedenstellend war. Des Weiteren konnte das Verhältnis der Koloniezahlen von Elutions-/Waschschrift im Vergleich zum Selektionsverfahren mit Streptavidin-Platten nicht verbessert werden (Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2). Zwei Lösungsansätze standen zur Optimierung im Vordergrund. Zunächst wurde im Zuge der Phagenamplifizierung eine Verkürzung der Generationszeit der *E. coli XII blue*-Zellen realisiert, die einen offenen Leserahmen in der Phagemid-DNA aufwiesen. Die Verkürzung der Generationszeit sollte eine erhöhte Konzentration von *E. coli*-Zellen in der Flüssigkultur ermöglichen, die einen offenen Leserahmen im Phagemid aufweisen. Eine erhöhte Konzentration von *E. coli XII blue*-Zellen in der Flüssigkultur, die Phagemide mit offenem Leserahmen tragen, sollte im Rahmen der Phagenamplifizierung aus dieser Kultur wiederum eine erhöhte Konzentration an

funktionalen rekombinanten Phagen bedingen. Weiterführend fand vor dem eigentlichen Selektionsverfahren eine Vorselektion funktionaler rekombinanter Phagen statt.

Realisiert werden konnte die verkürzte Generationszeit von *E. coli X11 blue*-Zellen mit einem offenen Leserahmen in der Phagemid-DNA durch die Verwendung von D-Glukose zur Unterdrückung der Basalexpression [208, 212]. Zur Amplifizierung und Sekretion der rekombinanten Phagen wurde der Glukosegehalt der Kultur von 20 mM auf 0 mM Glukose gesenkt, um die Unterdrückung der Basalexpression aufzuheben (Kapitel 4.2.1.2). Eine gezielte, zur Amplifizierung und Sekretion der rekombinanten Phagen notwendige Expression der Phagemid-DNA durch Induktion der Translation mittels IPTG bot keinen möglichen Lösungsansatz. Eine Lyse der Zellen konnte unabhängig von der Expressionstemperatur bereits nach etwa 3 Stunden ab Induktion gezeigt werden (Abbildung 5.15). Da die Amplifizierung und Sekretion rekombinanter Phagen über Nacht erfolgt, sollte die Biomasse innerhalb einer Kultur jedoch über einen Zeitraum von ~15 Stunden konstant bleiben. Zur weiteren Reduktion der Anzahl an rekombinanten Phagen, welche Phagemide mit *frameshift*-Mutationen tragen und keine funktionalen Trypsiligasevarianten präsentieren können, wurden diese vor dem eigentlichen Selektionsverfahren einer Vorselektion auf Funktionalität unterzogen. Ausgenutzt wurde hier der *MyCUT*-tag²⁶ *downstream* der Sequenz codierend für die Trypsiligasevarianten, wobei eine funktionale Sequenz codierend für die Trypsiligasevarianten einen funktionalen *MyCUT*-tag²⁶ bedingen sollte. Durch eine spezifische Bindung des *MyCUT*-tags²⁶ an immobilisierte anti-c-Myc-Antikörper im Rahmen eines *capture*-Experiments konnten nach Brechen dieser Antigen-Antikörper-Bindungen angereicherte funktionale Phagen erhalten werden. Die Elution der rekombinanten Phagen erfolgte durch eine Absenkung des pH-Wertes von pH 7,4 auf pH 2,6, wobei die Stabilität von *wt*-Trypsin präsentierenden rekombinanten Phagen unter diesen Bedingungen bereits gezeigt wurde [135]. Dieses Experiment zeigte zugleich den Erfolg des modifizierten Protokolls zur Amplifizierung und Sekretion rekombinanter Phagen mit Unterdrückung der Basalexpression bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion, da so das Verhältnis von spezifisch eluierten Phagen zu unspezifisch eluierten von 6 auf 28 gesteigert werden konnte. Als Referenz dienten rekombinante Phagen, welche nach dem ursprünglichen Protokoll ohne Unterdrückung der Basalexpression amplifiziert wurden. Ein weiterer möglicher Ansatz zur Wahrung der Stabilität des verwendeten Phagemid-Konstrukts wäre die Verwendung eines tet-Promoters [209]. Dieser Promoter zeigt

²⁶ *MyCUT*-tag: EQKLISEENLYFQG [152]

eine komplette, Glukose-unabhängige Repression und Regulierbarkeit der Proteinexpression durch Zugabe des Induktors Tetracyclin [209].

Final wurde ein Selektionsverfahren für optimierte Trypsiligasevarianten unter Einbeziehung aller gezeigten Optimierungsstufen durchgeführt. Es wurden auf Funktionalität vorselektierte rekombinante Phagen in dem Selektionsverfahren in Lösung unter Verwendung von Streptavidin-*beads* eingesetzt, bei deren Amplifizierung und Sekretion die Basalexpression des Phagemids bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion unterdrückt wurde. Die Anzahl unspezifisch eluierter Phagen im letzten Waschschriff konnte hierbei auf 0 gesenkt werden. Die Koloniezahl nach Titration des Elutionsschrittes lag mit 4 Kolonien zwar deutlich unter der in Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2 gezeigten, jedoch konnte somit gewährleistet werden, dass alle Kolonien analysiert wurden. Von den vier eluierten rekombinanten Phagen enthielten zwei einen Phagemid, der die Sequenz für eine Trypsiligasevariante im offenen Leserahmen enthielt. In korrespondierenden Überexpressionstests konnten entsprechende Expressionsbanden der Trypsiligasevarianten mit C-terminaler pIII-Fusion detektiert werden (Abbildung 5.17). Durch eine Sangersequenzierung der Phagemide konnten anschließend die Trypsiligasevarianten 4 und 5 identifiziert werden. Aufgrund der geringen Anzahl an rekombinanten Phagen, welche hier durch das Nukleophil eluiert werden konnten, und einer nicht auftretenden unspezifischen Elution von rekombinanten Phagen im letzten Waschschriff waren weitere Optimierungen zur Etablierung der Selektionsmethode an dieser Stelle nicht von Nöten. In Abbildung 5.18 ist anhand eines multiplen Sequenzalignments der identifizierten Trypsiligasevarianten und der Trypsiligase gezeigt, dass bei Trypsiligasevariante 1 als Ausnahme ein TGA-Stopcodon in der Phagemid-DNA enthalten war. Die weiteren enthaltenen Stopcodone der Trypsiligasevarianten 3 und 5 sind Amber-Stop-Codone (TAG), welche von den *E. coli Xll blue*-Zellen supprimiert werden können. Laut Literatur wird jedoch auch das Stopcodon TGA von *E. coli*-Zellen mit Amber-Suppressor-tRNA überlesen [182], so dass auch diese Trypsiligasevariante für weitere Charakterisierungen berücksichtigt wurde.

6.4 Analyse der identifizierten Trypsiligasevarianten

Für die Charakterisierung der Trypsiligasevarianten konnten diese in ausreichenden Mengen in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Korrespondierende Methoden zur Expression und Reinigung sind unter Kapitel 4.7.2 zusammengefasst. Die Reinheit aller Trypsiligasevarianten >90 % (sichtbare Homogenität) wurde mittels SDS-PAGE bestätigt, was exemplarisch für die Trypsiligasevariante 4 gezeigt ist (Abbildung 5.19). Die Identitäten der Trypsiligasevarianten wurden massenspektrometrisch bestätigt (Tabelle 5.4).

Durch die angewendete Selektion sollten identifizierte Trypsiligasevarianten weiterhin durch Peptide mit der Trypsiligase-spezifischen Erkennungssequenz YRH acyliert werden können, da ein Peptid mit dieser Erkennungssequenz für die Selektion verwendet wurde. Die Acylierung der Trypsiligasevarianten stellte dabei den initialen Selektionsschritt dar. Die initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeiten für diese Erkennungssequenz sollten jedoch im Vergleich zur Trypsiligase signifikant reduziert sein, was im Rahmen von Peptidhydrolysestudien bestätigt werden konnte (Tabelle 5.5).

Eine Veränderung der Substratpräferenzen gerade im S1- bzw. S1'-Bindungsort ist durch das Einführen weiterer 2 bzw. 3 Mutationen in diesen Regionen generell denkbar, was sich durch Hydrolysestudien ausgewählter Peptidsubstrate für die Trypsiligasevariante 3 und 4 bestätigte (Abbildung 5.22). Zur Einschätzung der Substratpräferenzen wurden die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten für die jeweiligen Peptidsubstrate herangezogen. Die Substratspezifitäten eines Biokatalysators hingegen können durch Betrachtung der Michaelis-Menten-Theorie ermittelt werden [213]. Spezifitätsdifferenzen eines Biokatalysators für verschiedene Substrate haben nach der Michaelis-Menten-Theorie zum einen Einfluss auf die Affinität des Enzyms zum jeweiligen Substrat und somit auf die Michaelis-Konstante (K_m), zum anderen haben sie Einfluss auf die katalytische Konstante (k_{cat}), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion abbildet [213]. Der Quotient aus k_{cat}/K_m einer *steady state*-Kinetik beschreibt dabei die katalytische Effizienz des Enzyms [2] unter Verwendung eines Substrates und ist somit ein Maß für die Spezifität des Enzyms zu diesem Substrat [84, 213]. Der Quotient aus k_{cat}/K_m wird daher auch als Spezifitätskonstante bezeichnet [87]. Unter Betrachtung von initialen Hydrolysegeschwindigkeiten individueller Substrate bei gleicher Substratkonzentration erhält man eine Aussage über die Geschwindigkeit der initialen Produktbildung katalysiert durch die eingesetzte Trypsiligasevariante, gleich welcher Ursache. Man erhält somit keine Aussage über die kinetischen Konstanten k_{cat} und K_m , die für die Unterschiede der initialen Hydrolysegeschwindigkeiten verantwortlich sind. Die Kenntnis über die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten der Substrate unter den gewählten Bedingungen war an dieser Stelle jedoch ausreichend, um eine Aussage über die Eignung eines Substrates treffen zu können. Als Substrate eignen sich in erster Linie Verbindungen, die von der jeweiligen Trypsiligasevariante unter den gewählten Bedingungen umgesetzt werden. Nur in einem solchen Fall eignet sich ein Peptid beispielsweise als Acyldonorkomponente für eine Transamidierungsreaktion. Die Trypsiligasevarianten 1 und 5 zeigten im Rahmen der durchgeführten Hydrolysestudien keine eindeutige Diskriminierung zwischen den aromatischen Aminosäureseitenketten Tyrosin und Phenylalanin in P1-Position sowie zwischen den beiden basischen Aminosäureseitenketten

Arginin und Lysin in P1'-Position. Die fehlende Diskriminierung zwischen Lysin und Arginin lässt sich durch die ähnliche Struktur und Ladung der beiden Aminosäureseitenketten erklären. Zudem handelt es sich um zwei Aminosäuren mit ähnlichem Raumbedarf. Das Van-der-Waals-Volumen liegt für Arginin bei 148 \AA^3 und für Lysin bei 135 \AA^3 [214]. Für diese Trypsiligasevarianten rückt vermutlich auch die Einbindung der Tyrosinseitenkette in den S1-Bindungsort über Wasserstoffbrückenbindungen in den Hintergrund, welche für die Trypsiligase beschrieben wurde (Kapitel 1.2.3.1.1). Die Hydroxylgruppe der Tyrosinseitenkette bildet hier Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonylsauerstoffatomen der Glycinreste 219, 216 und 226 im S1-Bindungsort aus. Da eine Phenylalaninseitenkette in P1-Position des Substrates ähnlich gut in den S1-Bindungsort eingebunden wird, diese Aminosäure aber über keine Hydroxylgruppe verfügt, scheinen hier noch andere Interaktionen eine Rolle zu spielen. Denkbar wären hydrophobe Interaktionen, da beide Trypsiligasevarianten im S1-Bindungsort über Aminosäureaustausche verfügen, welche den S1-Bindungsort im Vergleich zur Trypsiligase weniger hydrophil machen (Trypsiligasevariante 1: S190A/Q192H – Hydrophobizitätsindex nach Kyte & Doolittle [215]: $-1,4$, Trypsiligasevariante 5: S190P/Q192W – Hydrophobizitätsindex nach Kyte & Doolittle [215]: $-2,5$, Trypsiligase: S190/Q192 – Hydrophobizitätsindex nach Kyte & Doolittle [215]: $-4,5$, eine größere (weniger negative) Zahl bedeutet eine geringere Hydrophilie). Ebenfalls denkbar wären *stacking*-Ereignisse [216] zwischen aromatischen Aminosäuren des S1-Bindungsortes und der ebenfalls aromatischen Aminosäure in P1-Position des Substrates. Unterstützt wird diese Annahme durch eine effiziente Umsetzung des Peptides Bz-AAWRHAG katalysiert durch die Trypsiligasevariante 5 mit der hydrophoben, aromatischen Aminosäureseitenkette Tryptophan in P1-Position. Die Mutation S190P in Trypsiligasevariante 5 könnte zusätzlich eine Aufweitung des S1-Bindungsortes bewirken, was die Einbindung der Tryptophanseitenkette erleichtern würde, da Tryptophan ein um $\sim 30 \text{ \AA}^3$ größeres Van-der-Waals-Volumen aufweist als Tyrosin bzw. Phenylalanin [214]. Beide Trypsiligasevarianten hydrolysieren Peptide mit den aliphatischen, hydrophoben Aminosäureseitenketten Leucin und Methionin in P1-Position mit einer vergleichbaren initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit wie z. B. Peptide mit der YRH-Erkennungssequenz. Dies könnte ebenfalls an der verminderten Hydrophilie des S1-Bindungsortes im Vergleich zur Trypsiligase liegen. Trypsiligasevariante 2 hydrolysierte die untersuchten Peptide an mehr als einer Position. Für dieses Enzym wurde daher auf die Angabe initialer Hydrolysegeschwindigkeiten bezogen auf einzelne Peptide verzichtet (Abbildung 5.21). Trypsiligasevariante 3 zeigte die höchste initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit gegenüber der Sequenz MRH. Diese Trypsiligasevariante weist jedoch im S1-Bindungsort die gleiche Aminosäuresequenz

auf wie die Trypsiligase, was die veränderte Substratpräferenz im S1-Bindungsort gegenüber der Trypsiligase nicht erklärt. Hier könnten möglicherweise Effekte eine Rolle spielen, die über den S1-Bindungsort hinausgehen. Eine in der Literatur beschriebene Unabhängigkeit der Bindungsorte S1 und S1' hinsichtlich der Auswirkung von eingefügten Mutationen auf die Substratspezifität [217] kann an dieser Stelle nicht bestätigt werden. Trypsiligasevariante 4 zeigte die höchste initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit für das Peptid Bz-AALRHAG mit der aliphatischen, hydrophoben Aminosäureseitenkette Leucin in P1-Position. Diese Trypsiligasevariante weist im Gegensatz zur Trypsiligase ebenfalls einen verminderten hydrophilen Charakter im S1-Bindungsort auf (Trypsiligasevariante 4: S190G/Q192M – Hydrophobizitätsindex nach Kyte & Doolittle [215]: 1,5, Trypsiligase: S190/Q192 – Hydrophobizitätsindex nach Kyte & Doolittle [215]: -4,5, eine größere (weniger negative) Zahl bedeutet eine geringere Hydrophilie), was die Einbindung hydrophoberer Aminosäureseitenketten begründen könnte. Eine weitere Erklärung für die Erkennung großer, hydrophober Aminosäureseitenketten in P1-Position des Substrates bietet der Vergleich dieser Trypsiligasevariante mit Chymotrypsin auf Aminosäureebene. Chymotrypsin, welches eine Spezifität für große, hydrophobe Aminosäureseitenketten in P1-Position des Substrates zeigt, weist wie Trypsiligasevariante 4 an Position 192 ein Methionin auf [218]. Die Mutation S190G könnte zudem eine räumliche Erweiterung des S1-Bindungsortes bewirken, wodurch aliphatische Aminosäureseitenketten in diesen Bindungsort eingebunden werden können. Die effiziente Hydrolyse der Sequenz MRH unterstützt diese These, da das Methionin eine Aminosäure mit gleichem Raumbedarf ist [214].

Eine signifikant geänderte Substratpräferenz im S1'-Bindungsort konnte für keine Trypsiligasevariante festgestellt werden. Substrate ohne P2'-Histidin wurden zudem von den Trypsiligasevarianten nicht hydrolysiert, was auf der fehlenden Komplexierung der Histidinseitenketten über Zinkionen beruht [97].

Zusammenfassend konnten somit im Vergleich zur Trypsiligase nur veränderte Substratpräferenzen im S1-Bindungsort festgestellt werden.

Die insgesamt höchste bestimmte initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit lag unter Verwendung der angepassten Erkennungssequenz MRH katalysiert durch Trypsiligasevariante 3 bei $2,0 \text{ min}^{-1}$. Verglichen mit der höchsten initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit von $10,0 \text{ min}^{-1}$, welche für die Trypsiligase gegenüber der der Erkennungssequenz YRH gemessen wurde [96], ist dieser Wert jedoch immer noch reduziert.

Somit zeigten alle identifizierten Trypsiligasevarianten signifikant reduzierte initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeiten. Die Auswahl von Trypsiligasevarianten mit dieser Eigenschaft war wie bereits diskutiert ein Ziel der Selektionsmethode, was somit erreicht wurde.

Aufgrund der durchgeführten Selektion sollten identifizierte Trypsiligasevarianten, die als Acyl-Enzyme vorliegen, weiterführend durch Peptide mit *N*-terminaler RH-Sequenz deacyliert werden können, da ein Peptid mit dieser Erkennungssequenz für die Selektion eingesetzt wurde. Die Deacylierung der kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate erfolgte dabei im letzten Selektionsschritt und resultierte in einer Peptidbindungsbildung (Abbildung 5.11 und Abbildung 5.13). Die identifizierten Trypsiligasevarianten wurden daher hinsichtlich ihres Transamidierungsverhaltens analysiert und die jeweiligen E-Werte wurden bestimmt. Aufgrund der bereits diskutierten unterschiedlichen Substratpräferenzen der Trypsiligasevarianten wurden die verwendeten Substrate angepasst und das präferierte Peptidsubstrat als Acyldonor verwendet. Für die Trypsiligasevarianten 1, 2, 5 und die Trypsiligase wurde als Acyldonor das Peptid Bz-AA X_{aa} RHAG eingesetzt. Für die Trypsiligasevariante 3 wurde das Peptid Bz-AA M RHAG und für Trypsiligasevariante 4 das Peptid Bz-AA L RHAG eingesetzt. Das Peptid RHAK wurde allgemein als Acylakzeptor verwendet, da es keine Hinweise auf veränderte Substratpräferenzen in den S1'- bzw. S2'-Bindungsorten der Trypsiligasevarianten im Vergleich zur Trypsiligase gab.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transamidierungsstudien, die durch die Trypsiligasevarianten katalysiert wurden, erfolgten wie unter Abbildung 6.1 gezeigt. Für die Trypsiligase wurde dies bereits unter Abbildung 1.4 schematisch gezeigt.

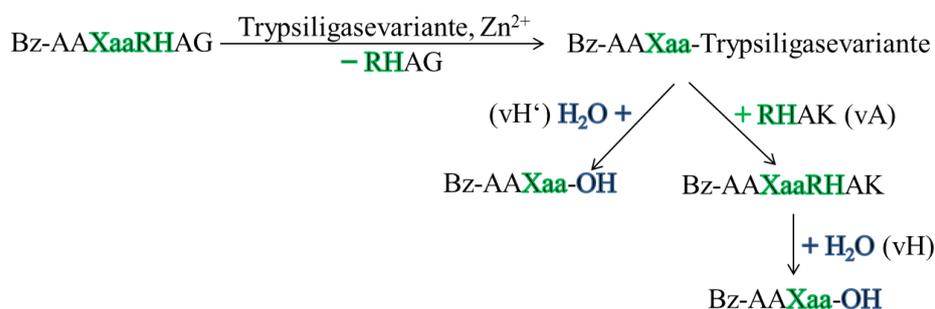


Abbildung 6.1: Schema einer Trypsiligasevarianten-katalysierten Transamidierungsreaktion (Schema erweitert nach: H. Jakubke [82]). vH: initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit, vH': initiale Primärhydrolysegeschwindigkeit, vA: initiale Aminolysegeschwindigkeit.

Die Bildung des Transamidierungsproduktes Bz-AA X_{aa} RHAK erfolgt im Rahmen der Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediate durch das Nukleophil RHAK mit einer initialen Aminolysegeschwindigkeit vA (Abbildung 6.1). Nach einer erfolgreichen Bil-

dung des Transamidierungsproduktes kann dieses durch die erneute Generierung der Erkennungssequenz XaaRH einer Hydrolyse mit einer initialen Sekundärhydrolysegeschwindigkeit v_H unterliegen, wodurch das Hydrolyseprodukt Bz-AAXaa gebildet wird. Die Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates kann konkurrierend jedoch auch durch Wassermoleküle erfolgen, wobei direkt das Hydrolyseprodukt Bz-AAXaa gebildet wird (v_H'). Der in Abbildung 5.23 gezeigte lineare Anstieg der Konzentration des Hydrolyseproduktes Bz-AAXaa mit der Reaktionszeit ist somit zum einen durch die Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates durch Wassermoleküle (v_H') und zum anderen durch die Sekundärhydrolyse (v_H) begründet. Die gezeigte Abnahme der Acyldonorkonzentration resultiert hingegen zum einen aus der Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates durch Wassermoleküle (v_H') und zum anderen aus der Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates durch ein peptidisches Nukleophil (v_A), wodurch das gewünschte Produkt gebildet wird. Zunächst wird anhand Abbildung 5.23 eindrucksvoll demonstriert, dass alle Trypsiligasevarianten in der Lage sind, Transamidierungsreaktionen zu katalysieren. Unter Betrachtung von Abbildung 5.23 können die Trypsiligasevarianten 3 und 4 verglichen mit der Trypsiligase weiterhin als optimierte Biokatalysatoren für die betrachteten Reaktionen herausgestellt werden. Die Trypsiligasevariante 3 zeigt einen 1,9-fach gesteigerten E-Wert, die Trypsiligasevariante 4 einen 2,3-fach gesteigerten E-Wert unter nahezu identischen Produktausbeuten von ca. 70 %. Diese Steigerung der E-Werte beruht auf einer Steigerung des Verhältnisses aus initialer Aminolyse- zu initialer Sekundärhydrolysegeschwindigkeit (v_A/v_H) um denselben Faktor, da die initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit im Verhältnis zur initialen Aminolysegeschwindigkeit reduziert ist ($v_H < v_A$). Ein solcher Zusammenhang aus initialer Sekundärhydrolyse- und initialer Aminolysegeschwindigkeit führt unter anderem zu stabileren Transamidierungsprodukten. Die signifikant verschlechterten Transamidierungsparameter der Trypsiligasevariante 2 liegen vermutlich in der bereits diskutierten Substratpräferenz begründet, da dieses Enzym die eingesetzten Peptide zur Transamidierung an mehr als einer Stelle hydrolysiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Trypsiligasevarianten eine Trypsiligase-ähnliche Aktivität aufweisen, da sie generell in der Lage sind, Transamidierungsreaktionen zu katalysieren. Zusätzlich weisen zwei der identifizierten Trypsiligasevarianten eine weitere gewünschte Eigenschaft auf, die wiederum aus der generell verminderten initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit resultiert. Die Trypsiligasevarianten 3 und 4 zeigen gesteigerte E-Werte im Vergleich zur Trypsiligase. Begründet liegen die gesteigerten E-Werte in einer – relativ zur initialen Aminolysegeschwindigkeit – verminderten initialen Sekundärhydrolysegeschwindigkeit.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse bezüglich gesteigerter E-Werte mit erzielten Literaturwerten, lässt sich herausstellen, dass die erzielten Ergebnisse im Rahmen des durchgeführten *Phage Display*-Projektes als erfolgreich einzustufen sind. Entsprechend eigener Recherche gibt es in der Literatur bis dato nur zwei Beispiele einer vergleichbaren Optimierung von Enzymen hinsichtlich katalytischer Reaktionen mittels *Phage Display*. Zum einen wurde versucht eine gesteigerte Umsatzgeschwindigkeit der H57A-Trypsinvariante gegenüber His-Lys- und His-Arg-Motiven zu erzielen, was aufgrund hoher Ansprüche an das Selektionsverfahren in diesem Fall nicht realisiert werden konnte [149]. Zum anderen wurden ausgehend von der *wt*-Subtiligase zwei Biokatalysatoren identifiziert, die hinsichtlich Peptidligationen eine 2,5- bis 2,7-fach erhöhte Aktivität zeigen [131]. Die Selektion beruhte hier jedoch auf einer Ligation der Substrate an den *N*-Terminus der Subtiligase selbst [131], was die Anwendbarkeit der Selektionsmethode auf Enzyme mit unfunktionalen *N*-Termini beschränkt. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Optimierungen der Trypsiligasevarianten 3 und 4 sind mit einem Faktor 1,9 bzw. 2,3 vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen. Jedoch ist die entwickelte und etablierte Selektionsmethode flexibel einsetzbar, da sie im Prinzip auf alle Enzyme anwendbar ist, die ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat ausbilden.

Die Betrachtung der Selektionsbedingungen, aus denen die Trypsiligasevarianten 3 und 4 hervorgegangen sind, zeigt zudem eindrucksvoll die Notwendigkeit der Etablierung geeigneter Selektionsbedingungen und eventueller Vor- bzw. Nachselektionsmethoden. Trypsiligasevariante 3 konnte durch eine Nachselektion der Ergebnisse erhalten werden, die durch das eigentliche *Phage Display* gewonnenen wurden. Bei der Nachselektion wurde auf Phagemid-DNA mit offenem Leserahmen selektiert. Trypsiligasevariante 4 hingegen konnte durch die Etablierung einer Vorselektion identifiziert werden, wobei unfunktionale rekombinante Phagen im Vorfeld abgereichert wurden. Zusätzlich wurde die Konzentration an Phagemiden mit offenen Leserahmen bereits während der Amplifizierung und Sekretion der rekombinanten Phagen gesteigert (Kapitel 5.4.3.1 und 6.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde angenommen, dass eine reduzierte initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit durch die Generierung eines hydrophoben aktiven Zentrums der Trypsiligasevarianten erreicht werden kann. Die gesteigerte Hydrophobizität sollte den Eintritt von hydrolytisch aktiven Wassermolekülen in das aktive Zentrum erschweren, wie es bereits für die Sortase A beschrieben ist [65]. Zur Evaluation dieses Sachverhaltes wurden die Hydrophobizitäten der Trypsiligasevarianten mit der Hydrophobizität der Trypsiligase verglichen. Dazu wurden die Hydrophobizitätsindices der mutierten Aminosäureseitenketten jeweils im

S1- (S190, Q192) bzw. S1'-Bindungsort (S61, R62, Q64) summiert und mit denen der Trypsiligase verglichen, wobei der Hydrophobizitätsindex nach Kyte & Doolittle verwendet wurde [215]. Da sich das hydrophobe Cluster idealerweise auf den gesamten Bereich des aktiven Zentrums ausweiten sollte, wurden zusätzlich die Hydrophobizitätsindices der mutierten Aminosäureseitenketten im S1- und S1'-Bereich summiert. Eine zusammenfassende Darstellung ist in Abbildung 6.2 gegeben.

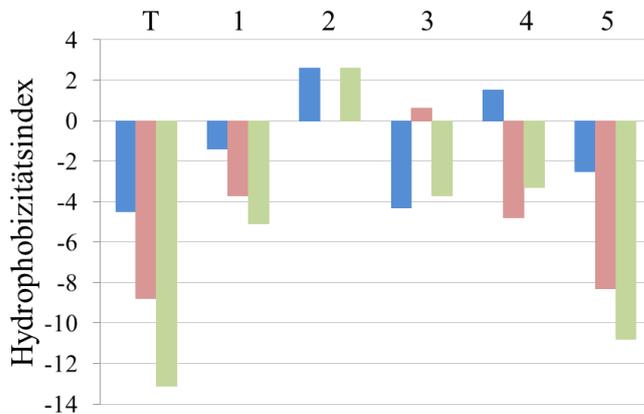


Abbildung 6.2: Summierte Hydrophobizitätsindices der mutierten Aminosäuren im S1- (Blau), S1'- (Rot) und S1- + S1'-Bindungsort (Grün). Hydrophobizitätsindex nach Kyte & Doolittle [215]. T: Trypsiligase, 1: Trypsiligasevariante 1, 2: Trypsiligasevariante 2, 3: Trypsiligasevariante 3, 4: Trypsiligasevariante 4, 5: Trypsiligasevariante 5.

Überraschenderweise ist der Hydrophobizitätsindex über alle mutierten Aminosäureseitenketten (grüner Balken) für die Trypsiligasevarianten (mit Ausnahme von Trypsiligasevariante 2) weiterhin negativ. Die hydrophilen Eigenschaften des aktiven Zentrums überwiegen demnach gegenüber hydrophoben Eigenschaften, obwohl der Hydrophobizitätsindex über alle mutierten Aminosäureseitenketten (grüner Balken) im Vergleich zur Trypsiligase leicht erhöht ist, was an größeren Werten (weniger negativen Werten) zu erkennen ist. Ein hydrophobes Cluster im aktiven Zentrum ist daher offensichtlich keine essentielle Anforderung an Trypsiligasevarianten, die eine verminderte initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit zeigen. Trotzdem ist an dieser Stelle nicht auszuschließen, dass die leicht reduzierte Hydrophilie in den aktiven Zentren die verminderten initialen Sekundärhydrolysegeschwindigkeiten der Trypsiligasevarianten hervorruft. Ebenfalls nicht auszuschließen ist eine mechanistisch bedingte Reduzierung der Hydrolysereaktion als solche. Möglich wäre an dieser Stelle beispielsweise eine Reduzierung der Aktivierung des hydrolytisch aktiven Wassermoleküls für den nukleophilen Angriff an das Acyl-Enzym-Intermediat, der zur Ausbildung eines tetrahedralen Übergangszustandes führt [84]. Das hydrolytisch aktive Wassermolekül nähert sich im *wt*-Trypsin dem Acyl-Enzym-Intermediat von Seiten der Abgangsgruppe, wobei der Winkel für den nukleophilen Angriff ca. 109° beträgt [84]. Zusätzlich muss eine Wasserstoffbrückenbindung zu

dem His57 erfolgen, wodurch das Wassermolekül deprotoniert wird [84]. Das heißt, dass die Abstände des hydrolytisch aktiven Wassermoleküls zum His57 und zum Carbonyl-Kohlenstoff des Acyl-Enzym-Intermediates definierte Werte aufweisen sollten, um die benötigten Bindungen auszubilden [165]. Zum His57 beträgt dieser Abstand im *wt*-Trypsin ca. 3 Å und zum Carbonyl-Kohlenstoff ca. 2–3 Å [165]. Aufgrund der Aminosäureaustausche in den Trypsiligasevarianten könnte die Einbindung und Aktivierung des hydrolytisch aktiven Wassermoleküls erschwert werden. Die auch im Verhältnis zur initialen Aminolysegeschwindigkeit reduzierte initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit bei Trypsiligasevariante 3 und 4 resultiert zwar in einem stabileren Transamidierungsprodukt, jedoch nicht in gesteigerten Ausbeuten im Vergleich zur Trypsiligase-katalysierten Reaktion. Im Rahmen der hier durchgeführten Transamidierungsreaktionen wurde aber nur die Produktbildung mit dem zugesetzten Nukleophil RHAK betrachtet. Aus dem eingesetzten Acyldonor Bz-AAXaaRHAG wird jedoch durch dessen Spaltung ebenfalls ein Nukleophil (RHAG) generiert, welches das Acyl-Enzym-Intermediat angreifen kann. Das Produkt dieser Transamidierungsreaktion ist folglich der eingesetzte Acyldonor Bz-AAXaaRHAG. Diese Produktbildung kann jedoch nicht quantifiziert werden. Es ist somit durchaus möglich, dass eine Ausbeutesteigerung an Transamidierungsprodukten erreicht wird, die jedoch analytisch nicht erfasst werden kann. Aus dem Selektionssubstrat Bio(PEG)₂-GAAYRHAAG würde man durch Hydrolyse das Nukleophil RHAAG erhalten, das dem Nukleophil RHAG strukturell ähnlich ist. Die Trypsiligasevarianten könnten somit eine höhere Affinität zu dem Nukleophil RHAG als zu dem Nukleophil RHAK aufweisen. Eine Einbindung des Nukleophils RHAG in das aktive Zentrum kann somit trotz einer geringeren Konzentration gegenüber dem Nukleophil RHAK an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine gesteigerte Ausbeute an gewünschtem Transamidierungsprodukt mit dem zugesetzten Nukleophil gezeigt werden konnte, wird in weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe zur Trypsiligase-Optimierung der Fokus unter anderem auf eine gesteigerte Produktausbeute im Rahmen von Transamidierungsreaktionen gelegt. Lohnenswerter Angriffspunkt ist dabei die Spezifitätserhöhung künftiger Trypsiligasevarianten für den Acylakzeptor. Eine hohe Spezifität für den Acylakzeptor resultiert in einer erhöhten initialen Aminolysegeschwindigkeit v_A verglichen mit der initialen Primärhydrolysegeschwindigkeit v_H . Die Kombination einer reduzierten initialen Sekundärhydrolysegeschwindigkeit mit einer hohen Spezifität der S'-Bindungsregion künftiger Trypsiligasevarianten sollte zu gesteigerten Produktausbeuten führen, da dann $v_A \gg v_H$, v_H' ist und somit die Aminolyse gegenüber der Primär- und Sekundärhydrolyse favorisiert wird (Abbildung 6.1). Wie bereits erwähnt ist eine Spezifitätserhöhung der Trypsiligasevarianten 3

und 4 für den Acylakzeptor RHAG an dieser Stelle nicht auszuschließen, die auch hier zu einer erhöhten Aminolysegeschwindigkeit im Verhältnis zu den Hydrolysegeschwindigkeiten v_H und $v_{H'}$ führen würde. Der zuvor beschriebene Zusammenhang, dass eine reduzierte Hydrolyseaktivität in Kombination mit einer hohen Spezifität in der S' -Bindungsregion zu einer Favorisierung der Aminolyse gegenüber der Hydrolyse führt, ist ebenfalls für die Sortase A beschrieben [65]. Die Sortase A zeigt eine 7-fach erniedrigte Michaelis-Konstante für den Acylakzeptor im Vergleich zum Acyldonor, was eine schnelle Deacylierung des kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates mittels Aminolyse bedingt [71]. Die Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates stellt in Anwesenheit peptidischer Acylakzeptoren somit auch bei der Sortase A den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar [71]. Die hohe Spezifität im S' -Bindungsort geht dabei mit einer ausschließlichen Akzeptanz für Glycin in $P1'$ -Position und einer Präferenz des $S2'$ -Bindungsortes ebenfalls für Glycin einher [71]. Eine Hydrolyse des gebildeten Acyl-Enzym-Intermediates findet bei der Sortase A nur in Abwesenheit eines geeigneten peptidischen Nucleophils statt [71], wobei dann die Deacylierung des gebildeten Acyl-Enzym-Intermediates den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt [71]. Innerhalb des Katalysemechanismus von *wt*-Trypsin hingegen stellt die Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates nur unter Verwendung von Estersubstraten den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, nicht aber unter Verwendung von Peptidsubstraten. Unter Verwendung von Peptidsubstraten stellt die Acylierung des Enzyms den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar [84, 98].

Eine weitere Möglichkeit die Produktausbeute bei Transamidierungsreaktionen zu steigern, bietet die direkte Selektion der Enzymvarianten, die hohe Produktausbeuten erzielen. Im Rahmen der durchgeführten Selektionsverfahren hätte eine Quantifizierung des entstehenden Transamidierungsproduktes theoretisch durch die Aminobenzoesäure (Abz) als Fluorophor des eingesetzten Nucleophils RHAADapAbz erfolgen können. Eine Quantifizierung konnte jedoch nicht realisiert werden, da sich die Aminobenzoesäure zur Quantifizierung des Transamidierungsproduktes in den hier verwendeten Konzentrationsverhältnissen als unpraktikabel herausstellte. Die Ausbeute an Transamidierungsprodukt lag somit unter der Nachweisgrenze des Fluorophors. Eine Steigerung der Sensitivität könnte durch die Verwendung von Nucleophilen mit Fluorophoren höherer Quantenausbeute erfolgen, wie beispielsweise eines Fluorescein- oder Rhodaminderivates. Jedoch weisen diese Fluorophore keine amino-säureähnliche Struktur mehr auf, sondern besitzen eher hydrophobe Eigenschaften. Dies kann zu einer vermehrten unspezifischen Bindung an zum Beispiel Gefäßoberflächen führen [219]. Eine Quantifizierung des Transamidierungsproduktes könnte ebenfalls durch die Verwendung

von Nukleophilen realisiert werden, die mit ausgewählten Antigenen fusioniert sind. Eine Quantifizierung der Produktausbeute kann dann durch Zugabe entsprechender Antikörper erfolgen. Eine weitere Möglichkeit zur Selektion von Trypsiligasevarianten, die eine hohe Ausbeute an Transamidierungsprodukt hervorrufen, bietet die Identifizierung von Trypsiligasevarianten die schnelle Aminolysegeschwindigkeiten v_A aufweisen. Ist die Aminolysegeschwindigkeit v_A in Relation zu v_H und $v_{H'}$ gesteigert ($v_A > v_H, v_{H'}$) kann eine Produktakkumulation erfolgen (Abbildung 6.1). Eine Selektion der Trypsiligasevarianten hinsichtlich hoher initialer Aminolysegeschwindigkeiten kann generell durch den Einsatz unterschiedlicher Nukleophilkonzentrationen sowie durch eine zeitaufgelöste Reaktionsführung bei der Elution realisiert werden. Dies könnte sogar direkt unter Verwendung der etablierten Selektionsmethode erfolgen. Bedingung der aufgezeigten Möglichkeiten zur Selektion von Enzymvarianten, die eine hohe Ausbeute an Transamidierungsprodukt hervorrufen ist neben der Möglichkeit einer Produktquantifizierung innerhalb der Selektion, die Realisierung einer vermehrten Anzahl an Klonen ohne unerwünschte Mutationsereignisse in der Phagemid-DNA (positive Klone) am Ende der Selektion, da nur so mehrere Selektionsrunden durchgeführt werden können (Kapitel 6.3).

6.5 Weiterführende Charakterisierung der Trypsiligasevariante 4

K60E/N143H/E151H/D189K/S61S/R62S/Q64H/S190G/Q192M

Zusätzlich zu den Transamidierungsreaktionen unter Verwendung von peptidischen Acyldonatoren (Kapitel 5.5.2.3 und 6.4) wurde eine beispielhafte Transamidierungsreaktion unter Verwendung eines proteinogenen Acyldonors analysiert. Die Trypsiligasevariante 4 wurde als Biokatalysator eingesetzt, da sie im Vergleich zur Trypsiligase mit einem 2,3-fach erhöhten E-Wert die beste Optimierung hinsichtlich ihres Transamidierungsverhaltens zeigte (Kapitel 5.5.2.3 und 6.4). Als proteinogenes Substrat wurde das anti-TNF α Fab-Fragment eingesetzt (Handelsname: CIMZIA[®]). Auf den strukturellen Aufbau bzw. den Wirkungsmechanismus von CIMZIA[®] wurde bereits in Kapitel 1.1 eingegangen. Dieses Fab-Fragment wurde C-terminal mit einer LRH-Erkennungssequenz versehen, da die Trypsiligasevariante 4, wie bereits diskutiert, eine Präferenz für diese Sequenz zeigt. Der Verlauf der Modifizierungsreaktion des Fab-Fragmentes ist schematisch in Abbildung 6.3 gezeigt:

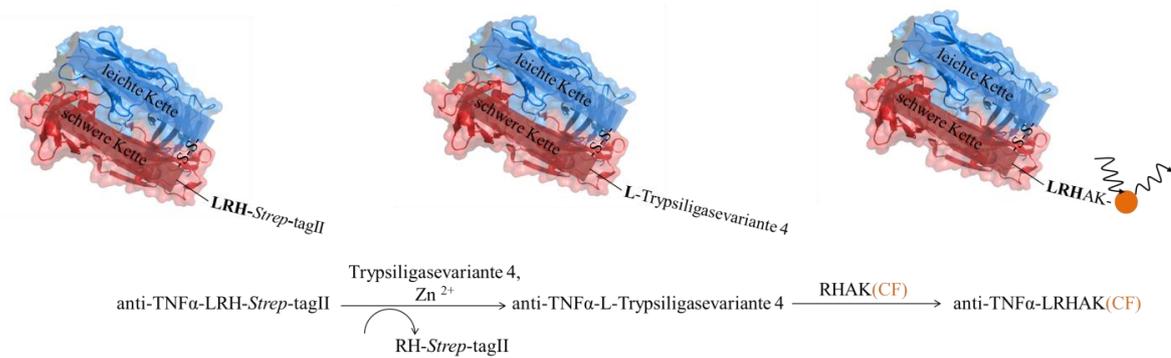


Abbildung 6.3: Modifizierungsschema zur Einführung der Fluoreszenzsonde 6-Carboxyfluorescein C-terminal an die schwere Kette des anti-TNF α Fab-Fragmentes katalysiert durch die Trypsiligasevariante 4. Pdb: 1N8Z²⁷, CF: Carboxyfluorescein, *Strep-tagII*: WSHQPFEK [154].

In einer Eintopf-Reaktion wird im Rahmen der Modifizierungsreaktion der C-terminale *Strep-tagII* [154] durch die Trypsiligasevariante 4 abgespalten. Die Erkennungssequenz LRH wird dabei C-terminal der Leucinseitenkette gespalten und das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat gebildet. Dieses wird dann in einer Aminolysereaktion unter Entstehung des gewünschten Produktes durch das Nukleophil RHAK(CF) deacyliert. Die Funktionalität des eingesetzten Fab-Fragmentes konnte vor und nach Modifizierung über eine intakte Antigenbindung mit einem K_D -Wert von 0,9 nM bestätigt werden [105]. Die erfolgreiche C-terminale Modifizierungsreaktion ist in Abbildung 5.27 gezeigt. Der E-Wert der Reaktion lag bei 9,0. Für eine Trypsiligase-katalysierte Reaktion unter vergleichbaren Bedingungen lag der E-Wert bei 1,5 [104]. Somit zeigt die Trypsiligasevariante 4 auch unter Verwendung eines proteinogenen Acyldonors im Rahmen einer Transamidierungsreaktion einen um den Faktor 6 gesteigerten E-Wert. Begründung für den gesteigerten E-Wert ist hier ebenfalls die erhöhte Stabilität des Reaktionsproduktes anti-TNF α -LRHAK(CF) ($v_A > v_H$), da die unter den gewählten Bedingungen erhaltenen Produktausbeuten bei beiden Reaktionen vergleichbar waren. Trypsiligase-katalysiert lag die erhaltene Produktausbeute bei ca. 23 % [104]. Katalysiert durch die Trypsiligasevariante 4 wurde eine Produktausbeute von ca. 31 % erhalten (siehe Kapitel 5.5.4). Der gesteigerte E-Wert der Transamidierungsreaktion unter Verwendung eines proteinogenen Acyldonors und der Trypsiligasevariante 4 bei vergleichbarer Produktausbeute im Verhältnis zu einer Trypsiligase-katalysierten Reaktion ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die bei der Transamidierungsreaktion mit peptischem Acyldonor erzielt wurden (Abbildung 5.23, Kapitel 6.4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es unter Verwendung der finalen Selektionsbedingungen gelungen ist, eine Trypsiligasevariante zu identifizieren, die – verglichen mit einer

²⁷ Die hier gezeigte Struktur ist ein anti-HER2 Fab-Fragment, da für das verwendete anti-TNF α Fab-Fragment keine Strukturdaten verfügbar waren.

Trypsiligase-katalysierten Reaktion – stabileres C-terminal modifiziertes Fab-Fragment ohne Ausbeuteverlust bildet. Durch Verwendung der Erkennungssequenz LRH, die in weniger als 5 % aller Proteine der *SwissProt*-Datenbank [103] präsent ist (eigene Recherche), sind unerwünschte Abbaureaktionen des Zielproteins während einer Modifizierungsreaktion vernachlässigbar.

Trypsiligasevariante 4 stellt somit einen geeigneten Kandidaten dar, um C-terminale Proteinmodifizierungen zu katalysieren. Daher wurden weiterführende Charakterisierungen dieser Trypsiligasevariante vorgenommen, die eine universelle Anwendbarkeit dieses Biokatalysators für C-terminale Proteinmodifizierungsreaktionen bestätigten. Fokus wurde hierbei auf die Reaktionstemperatur und den pH-Wert des Reaktionsansatzes gelegt, da Zielproteine aufgrund unterschiedlicher Thermostabilitäten und isoelektrischer Punkte ein enges pH- und Temperaturfenster aufweisen können, in dem Proteinmodifizierungen durchführbar sind. Ein breites pH- und Temperaturfenster katalytischer Aktivität der Trypsiligasevariante 4 ist somit grundlegende Bedingung für eine universelle Anwendbarkeit des Biokatalysators. Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Proteasekatalyse wurde ein Temperaturbereich von 10–35 °C gewählt, da eine Vielzahl von Proteinen bei diesen Temperaturen stabil ist. Die Trypsiligasevariante 4 zeigte unter den gewählten Bedingungen ein Temperaturoptimum bei 30 °C in dem untersuchten Temperaturbereich (Abbildung 5.24 A). Die geringste initiale Hydrolysegeschwindigkeit wurde bei 10 °C mit $2,5 \mu\text{M min}^{-1}$ ermittelt. Diese steigt mit linearer Abhängigkeit auf $6,3 \mu\text{M min}^{-1}$ bei 30 °C. Für die Trypsiligase hingegen konnte kein Temperaturoptimum bestimmt werden [96]. Die Aktivität dieses Biokatalysators steigt mit zunehmender Temperatur im untersuchten Temperaturbereich von 0–35 °C (Abbildung 5.24 B [96]). Das Auftreten eines Temperaturoptimums der Trypsiligasevariante 4 könnte in der durchgeführten Selektion begründet sein. Alle Selektionsschritte, bei denen eine Katalyse des Enzyms stattfand, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (ca. 23–28 °C). Ein weiterer möglicher Grund könnte eine thermische Instabilität der Trypsiligasevariante 4 sein. Temperaturen über 30 °C könnten bei diesem Enzym möglicherweise zu einem Struktur- und somit Aktivitätsverlust führen. Die Betrachtung der Calciumbindestelle könnte hier eine Erklärung bieten. *Wt*-Trypsin zeigt eine gesteigerte Aktivität und thermische Stabilität nach Binden eines Calciumions in der entsprechenden Calciumbindestelle [220, 221], da sich dies stabilisierend auf die Tertiärstruktur des Enzyms auswirkt [167]. Das Temperaturoptimum für *wt*-Trypsin bezüglich der Hydrolyse von denaturiertem Hämoglobin liegt ohne Zugabe von Calciumionen bei 35 °C. Durch die Zugabe von Calciumionen wird dieses auf 40 °C gesteigert [220].

Ein Abgleich der Tertiärstrukturen von *wt*-Trypsin (Blau) und Trypsiligase (Grün) im Bereich der Calciumbindestelle ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Die beiden Tertiärstrukturen der Calciumbindestellen weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Somit hat das Einführen der Mutationen der Trypsiligase (K60E/N143H/E151H/D189K) in *wt*-Trypsin keinen erkennbaren Einfluss auf die Tertiärstruktur der Calciumbindestelle. Die Aminosäureaustausche in Trypsiligasevariante 4 an den Positionen 61, 62 und 64 könnten sich jedoch aufgrund der räumlichen Nähe strukturell auf die Calciumbindestelle auswirken, was ebenfalls in Abbildung 6.4 veranschaulicht ist.

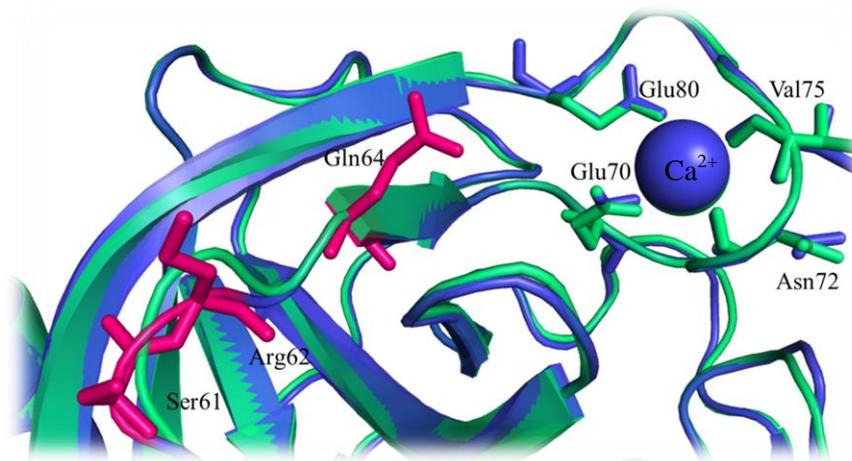


Abbildung 6.4: Abgleich der Tertiärstrukturen von *wt*-Trypsin (Blau) und Trypsiligase (Grün) im Bereich der Calciumbindestelle. Dargestellt sind die Aminosäurepositionen 61, 62 und 64 des anionischen Rattentrypsins (Magenta), das Calciumion und die Aminosäureseitenketten der Calciumbindestelle Glu70, Glu80, Asn72 und Val75 [222]. Pdb: 3FP6 (Blau), 4NIY (Grün).

Speziell der Aminosäureaustausch Q64H am Rande einer β -Faltblatt-Struktur könnte eine strukturelle Änderung durch das Einführen des Imidazolrings als β -Faltblatt-Brecher [223] bewirken. Eine sich auf die Calciumbindestelle fortsetzende Änderung der Tertiärstruktur und damit eine verminderte Einbindung von Calciumionen aufgrund veränderter Koordinierungsabstände der Aminosäureseitenketten zu dem Calciumion kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Ein Übergang der nativen Struktur der Trypsiligasevariante 4 in einen entfalteten Zustand ab 35 °C konnte jedoch durch CD-spektroskopische Untersuchungen nicht bestätigt werden (Abbildung 5.25 A). Eine irreversible thermische Entfaltung des Enzyms unter gleichen Bedingungen wie zur Bestimmung des Temperaturoptimums konnte erst bei ca. 70 °C beobachtet werden. Da auch die Trypsiligase bei dieser Temperatur in den entfalteten Zustand übergeht [96], erklärt dies nicht das auftretende Temperaturoptimum der Trypsiligasevariante 4 bei 30 °C, welches die Trypsiligase nicht aufweist.

Zur Untersuchung der pH-Wert-abhängigen Funktionalität der Trypsiligasevariante 4 wurden Hydrolysestudien des Peptids Bz-AAYRHAG im pH-Bereich von 6,2–9,0 durchgeführt.

Trypsiligase weist in diesem pH-Bereich zwei lokale pH-Optima auf (pH 6,6 und pH 7,8), wobei die höchste Amidaseaktivität bei pH 6,6 ermittelt wurde [96]. *Wt*-Trypsin besitzt für die proteolytische Spaltung proteinogener Substrate hingegen ein pH-Optimum von etwa pH 8,0 [221, 224]. Die Verschiebung des pH-Optimums der Amidaseaktivität von Trypsiligase wird hier mit der Ionisierung der Histidine erklärt, die an der Bindung von Peptidsubstraten beteiligt sind [96]. Die Trypsiligasevariante 4 hingegen weist für die untersuchte Reaktion nur ein pH-Optimum bei pH 7,5 auf (Abbildung 5.26 A). Das Substrat wird hier initial mit $10,2 \mu\text{M min}^{-1}$ umgesetzt. Das Optimum katalytischer Aktivität liegt somit 0,5 pH-Einheiten unter dem des *wt*-Trypsins, 0,3 pH-Einheiten unter dem zweiten pH-Optimum der Trypsiligase und 0,9 pH-Einheiten über dem ersten pH-Optimum der Trypsiligase. Eine Erhöhung des pH-Wertes um 0,3 pH-Einheiten auf pH 7,8 – dem zweiten pH-Optimum der Trypsiligase – bewirkt jedoch nur eine marginale Reduzierung der initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeit auf $9,6 \mu\text{M min}^{-1}$. Die leichte Verschiebung des pH-Optimums der Trypsiligasevariante 4 auf pH 7,5 könnte ein Ergebnis des Selektionsverfahrens sein, da dieses bei pH 7,5 durchgeführt wurde. Das pH-Optimum eines Enzyms wird unter anderem durch die Beteiligung ionischer Gruppen am katalytischen Mechanismus beeinflusst [2]. An der enzymatischen Säure-Base-Katalyse von *wt*-Trypsin und Trypsiligase sind die ionischen Gruppen der katalytischen Triade (Ser195, Asp102, His57) beteiligt, deren Protonierungszustände für die Reaktion essentiell sind [84]. Die katalytischen Triaden von *wt*-Trypsin, Trypsiligase und Trypsiligasevariante 4 sind hinsichtlich der Primärstruktur unverändert, so dass ein ähnliches pH-Optimum der Trypsiligasevariante 4 verglichen mit *wt*-Trypsin und Trypsiligase zu erwarten war. Zusätzlich wird das pH-Optimum eines Biokatalysators durch eine Beteiligung geladener Gruppen an der Stabilisierung der Proteinstruktur beeinflusst [2]. Da die Primärstrukturen von *wt*-Trypsin, Trypsiligase und der Trypsiligasevariante 4 aufgrund von Mutationen nicht identisch sind, könnte dies die leichten Verschiebungen der einzelnen pH-Optima erklären. Das pH-Optimum wird weiterhin durch den Dissoziationsgrad funktioneller Gruppen bestimmt, die an der Substratbindung beteiligt sind [2]. Wie bereits erwähnt wird das pH-Optimum der Trypsiligase bei pH 6,6 über diesen Zusammenhang erklärt [96]. Das pH-Optimum der Trypsiligase bei pH 6,6 weist die Trypsiligasevariante 4 jedoch nicht auf. Eine verminderte oder ausbleibende Substratbindung über die Komplexierung der Histidine in Position 143 und 151 sowie in P2'-Position des Substrates und ein damit einhergehender Verlust des pH-Optimums bei pH 6,6 kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Hydrolyse peptidischer Substrate weiterhin von Zinkionen abhängig ist (Kapitel 6.4). Die vermutete Begründung des ausgeprägten pH-Optimums der Amidaseaktivität der Trypsiligase bei pH 6,6 ausschließlich über die Kom-

plexierung des Substrates mit den artifiziellen Histidinresten [96] kann an dieser Stelle daher nicht bestätigt werden. Am isoelektrischen Punkt zeigt ein Enzym die geringste Löslichkeit [2], was ebenfalls zu einer verminderten katalytischen Aktivität bei einem pH-Wert führen kann, der dem isoelektrischen Punkt entspricht. Der isoelektrische Punkt der Trypsiligasevariante 4 liegt bei 5,37 und ist damit mit dem isoelektrischen Punkt der Trypsiligase (5,41) vergleichbar. Der Wegfall des pH-Optimums bei pH 6,6 ist somit auch nicht auf einer verminderten Löslichkeit der Trypsiligasevariante 4 bei pH 6,6 begründet. Obwohl das Einführen weiterer fünf Aminosäureaustausche bei dieser Trypsiligasevariante einen Einfluss auf die Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität hat, zeigt die Trypsiligasevariante 4 in dem betrachteten Temperatur- und pH-Bereich Aktivität, was eine universelle Anwendbarkeit dieses Biokatalysators für Proteinmodifizierungen ermöglicht.

Sämtliche Reaktionen für die Charakterisierung der Trypsiligasevarianten 1–5 wurden im Rahmen dieser Arbeit bei pH 7,8 durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse mit denen der Trypsiligase zu bewahren. Im Rahmen von Transamidierungsstudien werden Trypsiligase-katalysiert bei pH 7,8 stabilere Produkte erhalten als bei pH 6,6 [96]. Weiterführende und bereits beschriebene Studien zur Charakterisierung der Trypsiligase wurden daher ebenfalls bei pH 7,8 durchgeführt [96].

Abschließend lässt sich sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, neben der Trypsiligase einen weiteren universal einsetzbaren Biokatalysator (Trypsiligasevariante 4) für C-terminale Proteinmodifizierungen zu gewinnen, der sogar verbesserte E-Werte im Rahmen von Transamidierungsreaktionen zeigt. Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Etablierung des *Phage Display*-Verfahrens als solches für Optimierungsstudien der Trypsiligase. Initial sollte dabei die exemplarische Identifizierung von Trypsiligasevarianten mit Trypsiligase-ähnlicher Aktivität aber einer verminderten Sekundärhydrolyseaktivität realisiert werden. Die darüber hinausgehende Identifizierung eines weiteren universal einsetzbaren Biokatalysators, der sogar verbesserte E-Werte für Transamidierungsreaktionen zeigt, unterstreicht eindrucksvoll die erfolgreiche Etablierung des *Phage Display*-Verfahrens für Optimierungsstudien der Trypsiligase.

6.6 Besonderheiten der Trypsiligasevarianten hinsichtlich der Primärstruktur

Die identifizierten Trypsiligasevarianten 1–5 enthalten auf Aminosäureebene folgende Austausche im Überblick:

Trypsiligasevariante 1: K60E/N143H/E151H/D189K/S61A/R62K/Q64P/S190A/Q192H

Trypsiligasevariante 2: K60E/N143H/E151H/D189K/S61T/R62D/Q64V/S190V/Q192P

Trypsiligasevariante 3: K60E/N143H/E151H/D189K/S61H/R62G/Q64V/S190S/Q192Q

Trypsiligasevariante 4: K60E/N143H/E151H/D189K/S61S/R62S/Q64H/S190G/Q192M

Trypsiligasevariante 5: K60E/N143H/E151H/D189K/S61Q/R62Q/Q64Y/S190P/Q192W

In den aufgeführten fünf Trypsiligasevarianten lassen sich drei Besonderheiten erkennen (farbig hervorgehobene Aminosäuren). Zum einen enthalten die Trypsiligasevarianten 1, 3 und 4 ein Histidin im S1- bzw. S1'-Bindungsort und zum anderen zeigt sich ein Vorkommen von Prolin und Glycin in allen Trypsiligasevarianten. Proline und Glycine können Sekundärstrukturelemente unterbrechen [2, 225] bzw. fungieren häufig als β -turn-Bilder [226]. Die Aminosäure Histidin ist hier eine Besonderheit, da Histidine neben der Möglichkeit β -Faltblätter zu unterbrechen [223], in der Lage sind, über Metallionen zu komplexieren und somit Bindungen zwischen Histidinen in proteinogenen bzw. peptidischen Strukturen zu bilden.

Im Folgenden werden mögliche Gründe für eine Selektion unabhängig des Reaktionsmechanismus erläutert, welche auf den genannten Besonderheiten beruhen könnten.

Wie bereits unter Kapitel 1.2.3.1.1 erwähnt, ist die Trypsiligase in der Lage, über die Histidine 143 und 151 ein Histidin in P2'-Position eines geeigneten Substrates mit der Erkennungssequenz YRH zu komplexieren und dieses Substrat somit sehr spezifisch zu binden [96, 97]. Das Substrat, welches im Rahmen dieser Arbeit zur Selektion verwendet wurde, enthielt ebenfalls die YRH-Erkennungssequenz. Zusätzlich wurden dem Reaktionsansatz während der Selektion Zinkionen zugeführt, um die bereits angesprochene Zinkionen-induzierte Bindung der Erkennungssequenz YRH zu ermöglichen. Eine selektive Auswahl der Trypsiligasevarianten 1, 3 und 4 über eine Komplexierung der Histidine des Enzyms mit dem Histidin des Substrates wäre somit unabhängig vom Reaktionsmechanismus denkbar. Wie unter Abbildung 6.5 gezeigt, sind die gegen Histidin ausgetauschten Aminosäurepositionen oberflächlich im S1'-Bindungsort bzw. am Rande des S1-Bindungsortes lokalisiert, was eine Zugänglichkeit für Zinkionen bestätigt. Somit könnten zusätzlich zu der für die Trypsiligase beschriebenen Komplexierung [96, 97] weitere Komplexierungen auftreten.

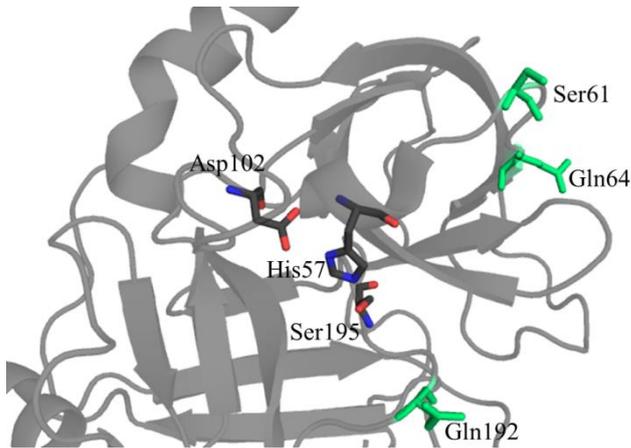


Abbildung 6.5: Dargestellt ist das aktive Zentrum der Trypsinlignase mit der katalytischen Triade. Gegen Histidin ausgetauschte Aminosäurepositionen sind Grün hervorgehoben. Pdb: 4NIY.

Ein diese Theorie unterstützendes, überwiegendes Auftreten von Histidinseitenketten in allen Trypsinlignasevarianten konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eine Selektion der Trypsinlignasevarianten über eine Zinkionen-vermittelte Komplexierung scheint bei der quantitativen Häufung von maximal einer zusätzlichen Histidinseitenkette pro Trypsinlignasevariante somit eher unwahrscheinlich. Zusätzlich werden für die effektive Komplexierung der Histidine über Zinkionen definierte Bedingungen benötigt. Die Komplexierung des Zinkions erfolgt in der Ebene durch die drei freien Elektronenpaare der Histidine 143 und 151 der Trypsinlignase und dem P2'-Histidin im Substrat [102, 227]. Die Bindungsabstände zwischen den freien Elektronenpaaren und dem Zinkion betragen dabei ungefähr 2 Ångström [102, 227]. Eine zufällige Realisierung all dieser Bedingungen unter Betrachtung der betreffenden Trypsinlignasevarianten ist aufgrund der erforderlichen Bindungsabstände zudem eher unwahrscheinlich. Der kleinste gemessene Abstand zwischen einem Histidin der Trypsinlignase und einer weiteren Mutationsstelle (Gln192) beträgt ca. 4,4 Å. Der kleinste Abstand zwischen zwei Mutationsstellen beträgt ca. 10,5 Å (Ser61 und Gln64). Eine schematische und exemplarische Darstellung der gemessenen Bindungsabstände ist in Abbildung 6.6 gegeben.

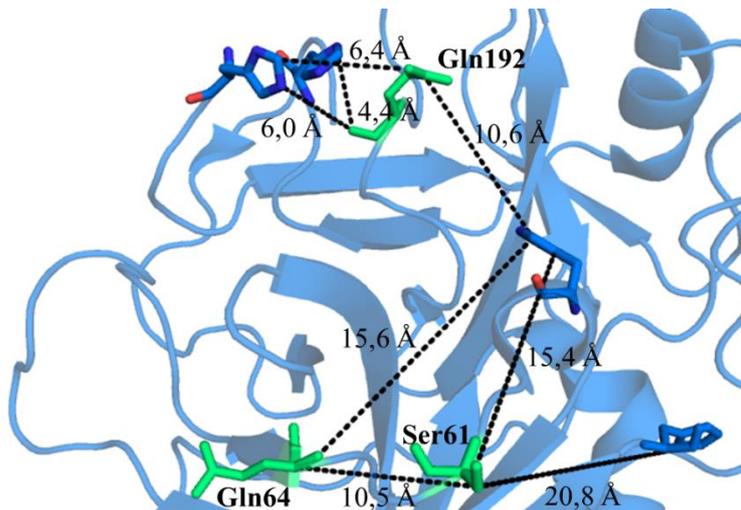


Abbildung 6.6: Schematische Darstellung der Bindungsabstände der Aminosäurepositionen Ser61, Gln64 und Gln192 untereinander und zu Histidinseitenketten der Trypsilgase. Pdb: 4NIY.

Eine Reduzierung der Bindungsabstände auf ca. 2 Ångström scheint somit selbst durch konformationelle Änderungen, die durch die Aminosäureaustausche S61H, Q64H und Q192H hervorgerufen werden könnten, eher unwahrscheinlich. Eine Zunahme von Komplexbindungen zwischen den Biokatalysatoren und dem verwendeten Substrat bei der Selektion, die zu einer Identifizierung dieser Trypsilgasevarianten unabhängig vom Katalysemechanismus hätten führen können, ist daher nicht wahrscheinlich. Ein genereller Ansatzpunkt für ein selektionsunabhängiges, gehäuftes Vorkommen von Aminosäuren ist die Verteilungshäufigkeit der Basentriplets codierend für die betreffende Aminosäure. In den verwendeten NNK²²-Oligonukleotiden liegt diese für Histidin bei 1/32. Für die Aminosäure Serin, welche in gleicher Anzahl innerhalb der Randomisierungsstellen in den identifizierten Trypsilgasevarianten vorkommt, liegt diese bei 3/32. Für die in verminderter Anzahl vorkommende Aminosäure Alanin bei 2/32. Die Verteilungshäufigkeit der verfügbaren Basentriplets erklärt somit ebenfalls nicht das gehäufte Vorkommen der Histidinseitenketten in den identifizierten Trypsilgasevarianten, was für eine gezielte Selektion über den Reaktionsmechanismus spricht.

Die signifikant verminderten initialen Peptidhydrolysegeschwindigkeiten der identifizierten Trypsilgasevarianten im Vergleich zur Trypsilgase (Tabelle 5.5 und Abbildung 5.22) könnten unabhängig vom Katalysemechanismus auch auf einem strukturell bedingten Aktivitätsverlust beruhen. Die Aminosäuren der Positionen 190–220 und somit auch die Randomisierungsstellen Ser190 und Gln192 befinden sich in einem flexiblen Bereich von Trypsin [167] und sind Teil der Aktivierungsdomäne, die aus den Aminosäureseitenketten der Positionen 1–19, 142–152, 184–193 und 216–223 gebildet wird [84, 228]. Der initiale Schritt, der für die Ausbildung einer korrekten Substratbindetasche und damit einer aktiven Enzymspezies ver-

antwortlich ist, ist die konformationelle Änderung der Asparaginsäureseitenkette an Position 194. Diese kann dann eine Salzbrücke zum *N*-Terminus des Isoleucins an Position 16 ausbilden, was eine Ausbildung des S1-Bindungsortes und des Oxyanionenloches zur Folge hat [84, 167]. Das Oxyanionenloch ist für die Stabilisierung des Oxyanions des tetrahedralen Übergangszustandes verantwortlich [84, 167]. Die Stabilisierung des Oxyanions beruht unter anderem auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäure in P1-Position und den NH-Gruppen des Peptidrückgrates der Aminosäuren Gly193 und Ser195 [167]. Eine weitere Aminosäureseitenkette mit besonderer Funktion für die Aktivität des Trypsins in der Nähe der randomisierten Positionen 190 und 192 ist das Cystein 191. Die Seitenkette des Cysteins 191, welche genau zwischen den beiden mutierten Positionen 190 und 192 liegt, bildet eine Disulfidbrückenbindung zur Seitenkette des Cysteins 220 aus [167]. Mutationen an den Positionen 190 und 192 und damit eventuell einhergehende strukturelle Änderungen könnten somit die Ausbildung der angesprochenen Disulfidbrückenbindung und die Ausbildung des S1-Bindungsortes inklusive der Bildung des Oxyanionenlochs erschweren. Unter diesen Umständen wäre mit einem Aktivitätsverlust der Trypsinligasevarianten zu rechnen, der in strukturellen Ursachen begründet läge. Eine Besonderheit der Trypsinligasevarianten 1, 2 und 5 ist das Vorkommen von Prolinseitenketten an den Positionen 64, 190 und 192. Bei der Position 64 handelt es sich um den Beginn eines β -Faltblattes, die Positionen 190 und 192 befinden sich wie bereits erwähnt in einem flexiblen Bereich des Enzyms [167]. Prolinseitenketten können in proteinogenen Strukturen Sekundärstrukturelemente unterbrechen [2, 223, 225], da diese Aminosäure innerhalb einer proteinogenen Struktur kein N^{α} -Wasserstoffatom mehr aufweist und somit nicht als Wasserstoffbrückendonator fungieren kann. Sekundäre Proteinstrukturelemente (α -helicale- und β -Faltblatt-Strukturen) beruhen jedoch auf der regelmäßigen Anordnung von Wasserstoffbrückenbindungen [2]. Somit kann das Vorhandensein von Prolinseitenketten in solchen sekundären Proteinstrukturelementen zu einer Unterbrechung dieser Strukturen führen. Zusätzlich handelt es sich durch die zyklische Struktur um eine sterisch anspruchsvolle Aminosäureseitenkette, was die Funktion von Prolin als α -Helix- (bzw. β -Faltblatt-Brecher) zusätzlich verstärken kann [229]. Weiterhin weisen sekundäre Proteinstrukturelemente bestimmte Torsionswinkel ϕ (Torsionswinkel der C_{α} -N-Bindung) auf. Für eine parallele β -Faltblatt-Struktur liegt dieser Winkel ϕ bei -119° , für eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur bei -139° [2]. Die zyklische Struktur von Prolin beruht auf der Bindung der Seitenkette mit der Amidgruppe des Rückgrates. Mögliche Konformationen des Rückgrates sind bezogen auf den Torsionswinkel ϕ daher stark eingeschränkt [229]. Der Torsionswinkel ϕ nimmt dabei Werte von ca. -65° an [229, 230], was die Funktion dieser

Aminosäure als β -Faltblatt-Brecher verstärkt. In der Literatur sind Aktivitätsverluste durch das Einfügen von Aminosäuren, welche Sekundärstrukturelemente unterbrechen, beschrieben [231]. Somit könnten die Trypsiligasevarianten 1, 2 und 5 einen strukturell bedingten Aktivitätsverlust aufweisen. Aufgrund der Lokalisation der Mutationstellen 190 und 192 in einem flexiblen Bereich der Biokatalysatoren [167], ist der strukturelle Einfluss der Prolinseitenketten bei den Trypsiligasevarianten 2 und 5 jedoch als gering einzuschätzen. Trypsiligasevariante 1 weist speziell an Position 64, dem Beginn eines β -Faltblattes, eine Prolinseitenkette auf. Durch diese Mutation könnte es zu einer Störung der β -Faltblatt-Struktur und damit einhergehend zu Änderungen in den sekundären Proteinstrukturelementen kommen. Des Weiteren ist das nativ enthaltene Glutamin an Position 64 an zahlreichen intramolekularen polaren Interaktionen beteiligt, welche in Abbildung 6.7 gezeigt sind.

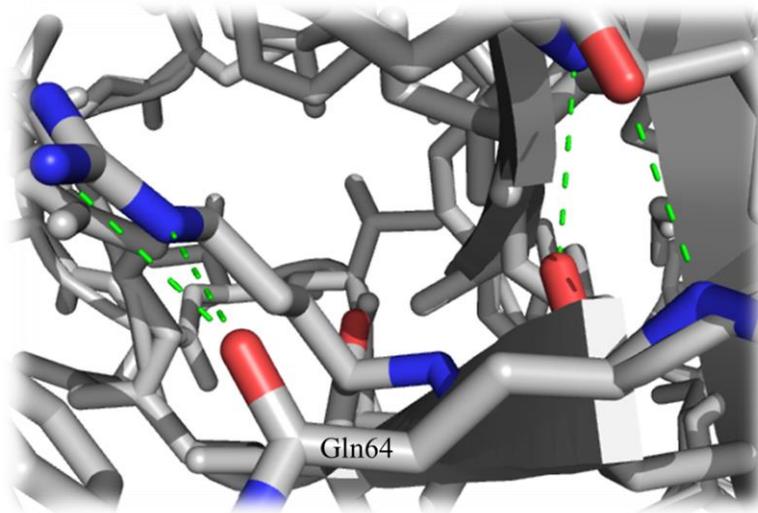


Abbildung 6.7: Darstellung der intramolekularen polaren Interaktionen (---) der Aminosäure Glutamin 64 innerhalb der Trypsiligase. Pdb: 4NIY.

Das N^{ϵ} -Wasserstoffatom geht hier auch tatsächlich eine Wasserstoffbrückenbindung zur Aminosäure am Ende des antiparallelen β -Faltblattes ein, was die Relevanz dieser Aminosäure innerhalb von Sekundärstrukturelementen unterstreicht. Die Verteilungshäufigkeit der Basentriplets, welche unter Verwendung von NNK²²-Oligonukleotiden für Prolin codieren (Verteilungshäufigkeit: 2/32), erklärt, wie bei dem bereits diskutierten gehäuften Vorkommen von Histidinseitenketten, auch hier nicht die hohe Anzahl von Prolinseitenketten in den selektierten Trypsiligasevarianten. Die Trypsiligasevariante 4 weist ebenfalls an Position 64 eine Histidinseitenkette auf, die aufgrund der unter physiologischen Bedingungen geladenen Seitenkette [232] ebenfalls als β -Faltblatt-Brecher bekannt ist [223]. Auch bei dieser Trypsiligasevariante kann es aufgrund einer Störung dieser β -Faltblatt-Struktur zu einer Änderung innerhalb der Sekundärstruktur und damit zu einem Aktivitätsverlust kommen. Die beiden Trypsiligase-

varianten 1 und 3 weisen an den Positionen 192 bzw. 61 ebenfalls Histidinseitenketten auf. Aufgrund der Lokalisation dieser Positionen in flexiblen Bereichen bzw. in *loop*-Regionen der Enzyme [101, 164, 167], ist der Einfluss möglicher Änderungen innerhalb der Sekundärstruktur auf die Enzymaktivität als gering einzustufen. Die Trypsiligasevarianten 3 und 4 weisen einen Aminosäureaustausch an den Positionen 62 und 190 gegen Glycin auf. Die Eigenschaft von Glycinresten als β -turn-Bilder zu fungieren [223], könnte hier ebenfalls eine Änderung innerhalb der Sekundärstruktur und einen damit einhergehenden Aktivitätsverlust bedeuten. Jedoch liegen diese Positionen – wie zum Teil bereits erwähnt – in flexiblen Bereichen bzw. in *loop*-Regionen der Enzyme [101, 164, 167], was einen strukturell bedingten Aktivitätsverlust durch das Vorhandensein der Glycinreste ebenfalls unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Vergleichende CD-Daten in Gegenwart von ZnCl_2 bzw. EDTA bestätigten zudem, dass alle Trypsiligasevarianten bezüglich der sekundären Proteinstrukturelemente der Trypsiligase ähnlich sind (Abbildung 5.20). Von einer verminderten Peptidhydrolysegeschwindigkeit aufgrund signifikanter Unterschiede bezogen auf die sekundären Proteinstrukturelemente kann somit nicht ausgegangen werden. Bis auf Trypsiligasevariante 5 zeigten alle Trypsiligasevarianten – wie auch die Trypsiligase – ein absolutes Minimum bei 208–210 nm, was auf einen, für Trypsin typischen hohen Anteil an β -Faltblatt-Strukturelementen hindeutet. Trypsiligasevariante 5 zeigte ein leicht verschobenes absolutes Minimum bei 207 nm. Eine Verschiebung des absoluten Minimums zu kürzeren Wellenlängen kann auf unstrukturierte Bereiche deuten. Ein *random coil*-Spektrum von Poly-L-Lysin weist ein absolutes Minimum bei unter 200 nm auf [233]. Die Verschiebung des absoluten Minimums von 208–210 nm auf 207 nm ist allerdings kein hinreichendes Kriterium, um von einer unstrukturierten Trypsiligasevariante auszugehen. Jedoch konnte bei Trypsiligasevariante 5 zudem eine, für unstrukturierte Bereiche typische Verringerung der Signalintensität beobachtet werden. Eine verminderte Peptidhydrolysegeschwindigkeit dieser Trypsiligasevariante, die auf einem Verlust an Sekundärstrukturelementen beruht, kann somit nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Diese Trypsiligasevariante katalysiert jedoch Transamidierungsreaktionen mit einem nur leicht reduzierten E-Wert von 12 (Abbildung 5.23), verglichen mit einer Trypsiligase-katalysierten Reaktion (E-Wert: 16). Daher gehe ich davon aus, dass diese Trypsiligasevariante trotzdem in der Lage ist, stabile kovalente Acyl-Enzym-Intermediate auszubilden und eine substrataktivierte Katalyse zeigt, die bereits für die Trypsiligase beschrieben ist [97]. Lokale Unterschiede bezüglich der sekundären Proteinstrukturelemente sind für die einzelnen Trypsiligasevarianten in Gegenwart von Zinkionen bzw. EDTA vorhanden, da die individuellen CD-Spektren einer Trypsiligase-

variante in Anwesenheit von Zinkionen und EDTA nicht deckungsgleich sind. Bei der Trypsiligase konnte dies nicht beobachtet werden. Hier sind die CD-Spektren in Anwesenheit von Zinkionen bzw. EDTA nahezu deckungsgleich. Die Änderungen innerhalb der sekundären Proteinstrukturelemente in Anwesenheit von Zinkionen bzw. EDTA könnten durch das Vorkommen von Histidinseitenketten an den Randomisierungsstellen hervorgerufen werden, welches für die Trypsiligasevarianten 1, 3 und 4 bereits diskutiert wurde. Die Zugabe von Zinkionen könnte somit intramolekular leichte Strukturänderungen hervorrufen, die auf einer Bindung der Zinkionen an die Histidinseitenketten beruhen könnten. Mögliche andere beteiligte Bindungspartner können an dieser Stelle jedoch nicht vorhergesagt werden.

Die hier diskutierten Punkte bestätigen somit zusätzlich zur enzymologischen Charakterisierung eine Selektion der Trypsiligasevarianten über den Reaktionsmechanismus, da eine Selektion über einen Struktur- und damit Aktivitätsverlust bzw. eine Selektion aufgrund von Komplexbindungen eher unwahrscheinlich ist. Ein zufälliges Auftreten der Aminosäureseitenketten Histidin und Prolin innerhalb der Randomisierungsstellen aufgrund der Verteilungshäufigkeiten der verfügbaren Basentriplets der NNK²²-Oligonukleotide kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, das *Phage Display*-Verfahren für die Optimierung der Trypsiligase initial zu etablieren und somit erstmals eine geeignete und universal einsetzbare Selektionsmethode zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiterführend die initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit der Trypsiligase reduziert werden, was in stabileren Transamidierungsprodukten resultiert. Die Identifizierung von Trypsiligasevarianten, die eine reduzierte Sekundärhydrolysegeschwindigkeit zeigen, sollte unter Verwendung der entwickelten und optimierten *Phage Display*-basierten Selektionsmethode erfolgen. Diese Optimierung des Biokatalysators wurde beispielhaft für weitere mögliche Optimierungen der Trypsiligase ausgewählt. Die Arbeitshypothese war, dass eine Reduzierung der Sekundärhydrolysegeschwindigkeit durch die Identifizierung von Trypsiligasevarianten mit einem artifiziellen hydrophoben Cluster im aktiven Zentrum erreicht werden kann. Das hydrophobe Cluster sollte das Eindringen von hydrolytisch aktiven Wassermolekülen in das aktive Zentrum sowie den Verbleib bereits vorhandener Wassermoleküle im aktiven Zentrum erschweren, wie es für die Sortase A als Modellenzym bereits beschrieben ist [65, 71].

Initialer Schritt für die Etablierung des *Phage Display*-Verfahrens für die Trypsiligase-Optimierung war die Bereitstellung einer Bibliothek an Trypsiligasevarianten sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene. Korrespondierende Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst:

- Innerhalb der Primärstruktur der Trypsiligase als Ausgangsvariante wurden Randomisierungsstellen in einem Radius von 10–20 Å um das katalytisch aktive Serin 195 ausgewählt. Die nativen Aminosäureseitenketten der ausgewählten Randomisierungsstellen weisen einen hydrophilen Charakter auf. Des Weiteren führt deren Austausch nicht bekanntermaßen zu einem Funktionsverlust des Enzyms. Resultierende Trypsiligasevarianten wiesen demnach auf Aminosäure-Ebene die Mutationen K60E/N143H/E151H/D189K/Ser61Xaa₁/Arg62Xaa₂/Gln64Xaa₃/Ser190Xaa₄/Gln192Xaa₅ auf.
- Zufällige Mutationen wurden zunächst durch die Verwendung von NNK²⁸-Oligonukleotiden in das Zielgen eingeführt. Die randomisierten Gensyntheseprodukte für die Trypsiligasevarianten wurden nachfolgend in den mpSCIL ligiert und anschließend in *E. coli XLI blue*-Zellen transformiert, wodurch die Bibliothek an Trypsiligase-

²⁸ N – ATGC, K – GT

varianten auf DNA-Ebene erhalten wurde. Die quantitative Abdeckung der theoretisch möglichen Bibliotheksgröße von $3,4 \times 10^7$ Varianten betrug 5 %.

- Für die Generierung der Bibliothek an Trypsiligasevarianten auf Proteinebene wurden geeignete Protokolle entwickelt. Die katalytische Aktivität Phagen-präsentierter Trypsiligase wurde unter ausgewählten Pufferbedingungen gezeigt, wobei die Umsetzung der Erkennungssequenz YRH im Fokus stand.

Für die Etablierung einer geeigneten Selektionsmethode wurden zunächst theoretische Betrachtungen angestellt und die Selektionsmethode als solche entwickelt, wobei das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat als Selektionsstruktur fungierte. Im Rahmen einer Optimierungsstudie wurden zielführende Selektionsbedingungen sowie ergänzende Vor- bzw. Nachselektionsverfahren etabliert. Die einzelnen Schritte der Optimierungsstudie sind im Folgenden zusammengefasst.

- Als Ausgangspunkt wurde eine Selektion unter Verwendung von Streptavidin-Platten zur Immobilisierung gebildeter kovalenter Acyl-Enzym-Intermediate durchgeführt.
- Für die Minimierung unspezifischer Bindungen der rekombinanten Phagen mit der Polystyroloberfläche wurde als erster Optimierungsschritt eine Selektion in Lösung unter Verwendung von Streptavidin-*beads* zur Immobilisierung etabliert. Des Weiteren erfolgte eine Reduzierung der durchgeführten Selektionsrunden von drei auf eine, da die Funktionalität der rekombinanten Phagen bereits nach der ersten Runde nicht mehr bestätigt werden konnte.
- Als Nachselektion wurden die aus einer Selektion erhaltenen Klone bezüglich einer hinreichend langsamen Wachstumsgeschwindigkeit untersucht ($< 0,5 \text{ OD}_{600 \text{ nm}}$ Einheiten in 30 Stunden), da eine Korrelation zwischen der Generationszeit der *E. coli X11 blue*-Zellen in Flüssigkultur und der Funktionalität der enthaltenen Phagemide gezeigt werden konnte.
- Eine Steigerung der Konzentration funktionaler rekombinanter Phagen innerhalb der Trypsiligasebibliothek auf Proteinebene wurde durch die Amplifizierung und Sekretion der rekombinanten Phagen nach einem modifizierten Protokoll erreicht. Die Basalexpression des verwendeten Phagemids wurde hier bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion unterdrückt.

- Als Vorselektion wurden funktionale rekombinante Phagen vor der eigentlichen Selektion ausgewählt, wobei der *MyCUT*-tag²⁹ *downstream* der Trypsiligasevarianten als Funktionalitätsmarker diente.
- Als Ergebnis aller durchgeführten Selektionen wurden 5 Trypsiligasevarianten identifiziert.

Nach erfolgreicher Darstellung und Reinigung der identifizierten Trypsiligasevarianten wurden diese 5 Biokatalysatoren für weitere Charakterisierungsstudien eingesetzt und hinsichtlich ausgewählter enzymologischer Parameter mit der Trypsiligase als Ausgangsvariante verglichen.

- Bei den identifizierten Trypsiligasevarianten 1, 3, 4 und 5 konnte eine signifikant reduzierte initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit gegenüber ausgewählten Substraten bestätigt werden.
- Studien zur Determinierung der Substratpräferenzen der Trypsiligasevarianten zeigten, dass zwei Trypsiligasevarianten (Trypsiligasevariante 3 und 4) im S1-Bindungsort veränderte Präferenzen aufwiesen. Trypsiligasevariante 3 zeigte die höchste initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit gegenüber der Sequenz MRH. Trypsiligasevariante 4 zeigte die höchste initiale Peptidhydrolysegeschwindigkeit für Peptide mit der Erkennungssequenz LRH. Die Trypsiligasevarianten 1 und 5 zeigten keine eindeutige Diskriminierung zwischen den Erkennungssequenzen L/M/F/YRH und Y/FKH.
- Für die Trypsiligasevariante 2 wurden im Rahmen der Hydrolysestudien keine Daten erhoben, da die verwendeten Peptide für diesen Biokatalysator mehr als eine Spaltstelle aufwiesen.
- Abschließend wurden die Trypsiligasevarianten 1–5 hinsichtlich ihres Transamidierungsverhaltens charakterisiert. Verwendet wurden peptidische Substrate und die präferierten Acylendonatoren wurden eingesetzt. Als Acylakzeptor wurde für alle Trypsiligasevarianten das Peptid RHAK verwendet. Als Ergebnis zeigten die beiden Trypsiligasevarianten 3 und 4 1,9- bzw. 2,3-fach gesteigerte E-Werte im Vergleich zur Trypsiligase bei nahezu gleichbleibender maximaler Produktausbeute. Begründet ist dies durch eine verminderte initiale Sekundärhydrolysegeschwindigkeit (erhöhte Produktstabilität) im Verhältnis zur initialen Aminolysegeschwindigkeit.

²⁹ *MyCUT*-tag: EQKLISEENLYFQG [152]

- Die enzymologische Charakterisierung der Trypsiligasevarianten bestätigte somit eine Selektion der Trypsiligasevarianten über den Reaktionsmechanismus. Von einer erfolgreichen Etablierung der Selektionsmethode kann somit ausgegangen werden.
- Eine Analyse der Randomisierungsstellen hinsichtlich einer gesteigerten Hydrophobizität der mutierten Aminosäureseitenketten bestätigte für diese einen weiterhin hydrophilen Charakter. Ein hydrophobes Cluster im aktiven Zentrum weist keine der identifizierten Trypsiligasevarianten auf.
- Durch vergleichende Untersuchungen der sekundären Proteinstrukturelemente wurde weiterführend ausgeschlossen, dass die gezeigte verminderte Peptidhydrolysegeschwindigkeit der Trypsiligasevarianten überwiegend auf Strukturverlusten beruht. Eine Selektion der Trypsiligasevarianten aufgrund von Komplexbindungen ist ebenfalls eher unwahrscheinlich, was die Selektion der Trypsiligasevarianten über den Reaktionsmechanismus zusätzlich bestätigt.

Die Trypsiligasevarianten 3 und 4 stellen verglichen mit der Trypsiligase optimierte Biokatalysatoren dar, da sie im Rahmen von Transamidierungsreaktionen gesteigerte E-Werte zeigten. Trypsiligasevariante 4 wurde aufgrund des höheren ermittelten E-Wertes für weiterführende Charakterisierungsstudien eingesetzt. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst:

- Es wurde eine Transamidierungsstudie unter Verwendung eines proteinogenen Acyldonors durchgeführt, wobei eine erfolgreiche C-terminale Modifizierung eines anti-TNF α Fab-Fragmentes gezeigt werden konnte. Die Produktausbeute lag bei 31 % und der E-Wert bei 9,0. Auch hier konnte eine erhöhte Produktstabilität aufgrund einer reduzierten initialen Sekundärhydrolysegeschwindigkeit verglichen mit einer Trypsiligase-katalysierten Reaktion gezeigt werden (E-Wert: 1,5, Ausbeute: 23 %). Das Ergebnis der Transamidierungsreaktion unter Verwendung des proteinogenen Acyldonors hinsichtlich eines gesteigerten E-Wertes bei vergleichbarer Produktausbeute korreliert somit mit dem Ergebnis einer Transamidierungsreaktion unter Verwendung eines peptidischen Acyldonors.

Die weiterführende Charakterisierung dieser Trypsiligasevariante hinsichtlich des pH- und Temperaturfensters, in dem der Biokatalysator eine katalytische Aktivität zeigt, verifiziert zudem die universelle Einsetzbarkeit dieses Biokatalysators für C-terminale Proteinmodifizierungen:

- Das Temperaturoptimum katalytischer Aktivität für eine Peptidhydrolyse lag bei 30 °C. In dem untersuchten Temperaturbereich von 10–35 °C zeigte die Trypsiligasevariante jedoch generell Aktivität, so dass Proteinmodifizierungen auch über- bzw. unterhalb des Temperaturoptimums des Biokatalysators durchgeführt werden können.
- Das pH-Optimum katalytischer Aktivität für eine Peptidhydrolyse lag bei pH 7,5, wobei die Trypsiligasevariante im pH-Bereich von pH 6,5–8,5 ebenfalls katalytische Aktivität zeigte. Somit sind auch hier individuelle Anpassungen der pH-Bedingungen an das Zielprotein möglich.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, das *Phage Display*-Verfahren zur Optimierung der Trypsiligase und – im Zuge dessen – eine innovative und universal einsetzbare Selektionsmethode erfolgreich zu etablieren. Mit dieser Selektionsmethode ist es möglich, Trypsiligasevarianten zu identifizieren, die kaum Sekundärhydrolyseaktivität zeigen, was in stabilen Transamidierungsprodukten und – verglichen mit Trypsiligase-katalysierten Transamidierungsreaktionen – in gesteigerten E-Werten resultiert. Zusätzlich konnte im Rahmen der Arbeit mit der Trypsiligasevariante 4 neben der bereits etablierten Trypsiligase ein weiterer, für C-terminale Proteinmodifizierungen sogar besser geeigneter und ebenfalls universal einsetzbarer Biokatalysator gewonnen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und Erkenntnisse werden von der Arbeitsgruppe bereits verwendet, um im Rahmen von industriellen Kooperationen die Trypsiligase weiter zu optimieren. Fokus dieser weiterführenden Arbeiten liegt hierbei auf einer Ausbeutesteigerung an C-terminal modifizierten Fab-Fragmenten. Erreicht werden soll dies über eine weitere Minimierung der Sekundärhydrolyseaktivität. Diese Minimierung soll hier unter anderem über eine Erhöhung der Spezifität von Trypsiligasevarianten zum peptidischen Nukleophil erreicht werden. Für die Optimierung der Trypsiligase hinsichtlich einer Spezifitätserhöhung für das peptidische Nukleophil wird die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Selektionsmethode über das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat als Selektionsstruktur von der Arbeitsgruppe bereits jetzt erfolgreich angewendet. Die weiterführende Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse innerhalb industrieller Kooperationen unterstreicht bereits jetzt die Relevanz der erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Entwicklung des *Phage Display*-Verfahrens für die Optimierung der Trypsiligase. Zukünftig sollte es daher möglich sein, noch weitere Fragestellungen hinsichtlich einer Trypsiligaseoptimierung unter Verwendung der hier etablierten Selektionsmethode im Rahmen eines *Phage Displays* zu lösen.

Literaturverzeichnis

1. Walsh, C. (2005). *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory* (Greenwood Village/USA: Roberts and Company Publishers).
2. Voet, D. and Voet, J.G. (2004). *Biochemistry*, 3rd Edition (Hoboken/USA: John Wiley & Sons, Inc).
3. Brocchini, S., Balan, S., Godwin, A., Choi, J.-W., Zloh, M. and Shaunak, S. (2006). PEGylation of native disulfide bonds in proteins. *Nat Protoc* **1**, 2241–2252.
4. Smith, R.A., Dewdney, J.M., Fears, R. and Poste, G. (1993). Chemical derivatization of therapeutic proteins. *Trends Biotechnol.* **11**, 397–403.
5. Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A. and Veronese, F.M. (2008). Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 13–28.
6. Hershfield, M.S., Buckley, R.H., Greenberg, M.L., Melton, A.L., Schiff, R., Hatem, C., Kurtzberg, J., Markert, M.L., Kobayashi, R.H. and Kobayashi, A.L. (1987). Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *N. Engl. J. Med.* **316**, 589–596.
7. Torriani, F.J., Rodriguez-Torres, M., Rockstroh, J.K., Lissen, E., Gonzalez-Garcia, J., Lazzarin, A., Carosi, G., Sasadeusz, J., Katlama, C., Montaner, J., et al. (2004). Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.* **351**, 438–450.
8. Graham, M.L. (2003). Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1293–1302.
9. Pidaparti, M. and Bostrom, B. (2012). Comparison of allergic reactions to pegasparaginase given intravenously versus intramuscularly. *Pediatr Blood Cancer* **59**, 436–439.
10. Masetti, R. and Pession, A. (2009). First-line treatment of acute lymphoblastic leukemia with pegasparaginase. *Biologics* **3**, 359–368.
11. Beck, A., Haeuw, J.-F., Wurch, T., Goetsch, L., Bailly, C. and Corvaia, N. (2010). The next generation of antibody-drug conjugates comes of age. *Discov Med* **10**, 329–339.
12. Sandborn, W.J., Schreiber, S., Feagan, B.G., Rutgeerts, P., Younes, Z.H., Bloomfield, R., Coteur, G., Guzman, J.P. and D'Haens, G.R. (2011). Certolizumab pegol for active Crohn's disease: a placebo-controlled, randomized trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 670-678.e3.
13. Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Stoinov, S., Honiball, P.J., Rutgeerts, P., Mason, D., Bloomfield, R. and Schreiber, S. (2007). Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **357**, 228–238.
14. Lang, L. (2008). FDA approves Cimzia to treat Crohn's disease. *Gastroenterology* **134**, 1819.
15. Schreiber, S., Rutgeerts, P., Fedorak, R.N., Khaliq-Kareemi, M., Kamm, M.A., Boivin, M., Bernstein, C.N., Staun, M., Thomsen, O.Ø. and Innes, A. (2005). A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* **129**, 807–818.
16. Deeks, E.D. (2013). Certolizumab pegol: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* **73**, 75–97.
17. Keystone, E., van der Heijde, D., Mason, D., Landewé, R., van Vollenhoven, R., Combe, B., Emery, P., Strand, V., Mease, P., Desai, C., et al. (2008). Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum.* **58**, 3319–3329.

18. Choy, E.H.S., Hazleman, B., Smith, M., Moss, K., Lisi, L., Scott, D.G.I., Patel, J., Sopwith, M. and Isenberg, D.A. (2002). Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF fragment (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis: a phase II double-blinded, randomized, dose-escalating trial. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 1133–1137.
19. Sassoon, I. and Blanc, V. (2013). Antibody-drug conjugate (ADC) clinical pipeline: a review. *Methods Mol. Biol.* **1045**, 1–27.
20. Flygare, J.A., Pillow, T.H. and Aristoff, P. (2013). Antibody-drug conjugates for the treatment of cancer. *Chem Biol Drug Des* **81**, 113–121.
21. Bouchard, H., Viskov, C. and Garcia-Echeverria, C. (2014). Antibody-drug conjugates – a new wave of cancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 5357–5363.
22. Chen, X., Ding, G., Gao, Q., Sun, J., Zhang, Q., Du, L., Qiu, Z., Wang, C., Zheng, F., Sun, B., et al. (2013). A human anti-c-Met Fab fragment conjugated with doxorubicin as targeted chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* **8**, e63093.
23. Merrifield, R. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis, The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154.
24. Kent, S.B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 957–989.
25. Köhn, M. and Breinbauer, R. (2004). The Staudinger ligation—a gift to chemical biology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 3106–3116.
26. Nilsson, B.L., Kiessling, L.L. and Raines, R.T. (2000). Staudinger ligation: a peptide from a thioester and azide. *Org. Lett.* **2**, 1939–1941.
27. Saxon, E., Armstrong, J.I. and Bertozzi, C.R. (2000). A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. *Org. Lett.* **2**, 2141–2143.
28. Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I. and Kent, S.B. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **266**, 776–779.
29. Nilsson, B.L., Hondal, R.J., Soellner, M.B. and Raines, R.T. (2003). Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 5268–5269.
30. Kurtenbach, E. and Verjovski-Almeida, S. (1985). Labeling of a thiol residue in sarcoplasmic reticulum ATPase by pyrene maleimide. Solvent accessibility studied by fluorescence quenching. *J. Biol. Chem.* **260**, 9636–9641.
31. Saviranta, P., Haavisto, T., Rappu, P., Karp, M. and Lovgren, T. (1998). In vitro enzymatic biotinylation of recombinant fab fragments through a peptide acceptor tail. *Bioconjug. Chem.* **9**, 725–735.
32. Boccu, E., Largajolli, R. and Veronese, F.M. (1983). Coupling of monomethoxypolyethyleneglycols to proteins via active esters. *Z Naturforsch [C]* **38**, 94–99.
33. Lundblad, R.L. and Bradshaw, R.A. (1997). Applications of site-specific chemical modification in the manufacture of biopharmaceuticals: I. An overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**, 143–151.
34. Smith, J.J., Conrad, D.W., Cuneo, M.J. and Hellinga, H.W. (2005). Orthogonal site-specific protein modification by engineering reversible thiol protection mechanisms. *Protein Sci.* **14**, 64–73.
35. Ducry, L. and Stump, B. (2010). Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug. Chem.* **21**, 5–13.
36. Maruani, A., Smith, M.E.B., Miranda, E., Chester, K.A., Chudasama, V. and Caddick, S. (2015). A plug-and-play approach to antibody-based therapeutics via a chemoselective dual click strategy. *Nat Commun* **6**, 6645.
37. Wang, L., Amphlett, G., Blättler, W.A., Lambert, J.M. and Zhang, W. (2005). Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry. *Protein Sci.* **14**, 2436–2446.
38. Hamblett, K.J., Senter, P.D., Chace, D.F., Sun, M.M.C., Lenox, J., Cervený, C.G., Kissler, K.M., Bernhardt, S.X., Kopcha, A.K., Zabinski, R.F., et al. (2004). Effects of drug loading

- on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7063–7070.
39. Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J. and Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr. Purif.* **41**, 98–105.
40. Waugh, D.S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* **23**, 316–320.
41. Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A. (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.* **23**, 605–613.
42. Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544.
43. Michaelson, D. and Philips, M. (2006). The use of GFP to localize Rho GTPases in living cells. *Meth. Enzymol.* **406**, 296–315.
44. Schlapschy, M., Binder, U., Börger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. and Skerra, A. (2013). PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 489–501.
45. Kampmeier, F., Ribbert, M., Nachreiner, T., Dembski, S., Beaufils, F., Brecht, A. and Barth, S. (2009). Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-O-alkylguanine DNA alkyltransferase. *Bioconjug. Chem.* **20**, 1010–1015.
46. Gronemeyer, T., Chidley, C., Juillerat, A., Heinis, C. and Johnsson, K. (2006). Directed evolution of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 309–316.
47. Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H. and Johnsson, K. (2003). A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat. Biotechnol.* **21**, 86–89.
48. Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H. and Johnsson, K. (2004). Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9955–9959.
49. Budisa, N., Minks, C., Alefelder, S., Wenger, W., Dong, F., Moroder, L. and Huber, R. (1999). Toward the experimental codon reassignment in vivo. protein building with an expanded amino acid repertoire. *Faseb J.* **13**, 41–51.
50. Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C. and Schultz, P.G. (1989). A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* **244**, 182–188.
51. Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., et al. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 16101–16106.
52. Schatz, P.J. (1993). Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)* **11**, 1138–1143.
53. Sato, H., Hayashi, E., Yamada, N., Yatagai, M. and Takahara, Y. (2001). Further studies on the site-specific protein modification by microbial transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **12**, 701–710.
54. Chen, J.S. and Mehta, K. (1999). Tissue transglutaminase. an enzyme with a split personality. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 817–836.
55. Lorand, L. and Graham, R.M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 140–156.
56. Mindt, T.L., Jungi, V., Wyss, S., Friedli, A., Pla, G., Novak-Hofer, I., Grünberg, J. and Schibli, R. (2008). Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **19**, 271–278.

57. Josten, A., Haalck, L., Spener, F. and Meusel, M. (2000). Use of microbial transglutaminase for the enzymatic biotinylation of antibodies. *J. Immunol. Methods* **240**, 47–54.
58. Strop, P., Liu, S.-H., Dorywalska, M., Delaria, K., Dushin, R.G., Tran, T.-T., Ho, W.-H., Farias, S., Casas, M.G., Abdiche, Y., et al. (2013). Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. *Chem. Biol.* **20**, 161–167.
59. Jeger, S., Zimmermann, K., Blanc, A., Grunberg, J., Honer, M., Hunziker, P., Struthers, H. and Schibli, R. (2010). Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 9995–9997.
60. Pritz, S., Wolf, Y., Kraetke, O., Klose, J., Bienert, M. and Beyermann, M. (2007). Synthesis of biologically active peptide nucleic acid-peptide conjugates by sortase-mediated ligation. *J. Org. Chem.* **72**, 3909–3912.
61. Guimaraes, C.P., Witte, M.D., Theile, C.S., Bozkurt, G., Kundrat, L., Blom, A.E.M. and Ploegh, H.L. (2013). Site-specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions. *Nat Protoc* **8**, 1787–1799.
62. Kruger, R.G., Otvos, B., Frankel, B.A., Bentley, M., Dostal, P. and McCafferty, D.G. (2004). Analysis of the substrate specificity of the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA. *Biochemistry* **43**, 1541–1551.
63. Mazmanian, S.K., Ton-That, H. and Schneewind, O. (2001). Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **40**, 1049–1057.
64. Witte, M.D., Theile, C.S., Wu, T., Guimaraes, C.P., Blom, A.E.M. and Ploegh, H.L. (2013). Production of unnaturally linked chimeric proteins using a combination of sortase-catalyzed transpeptidation and click chemistry. *Nat Protoc* **8**, 1808–1819.
65. Zong, Y., Bice, T.W., Ton-That, H., Schneewind, O. and Narayana, S.V. (2004). Crystal structures of *Staphylococcus aureus* sortase A and its substrate complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 31383–31389.
66. Theile, C.S., Witte, M.D., Blom, A.E.M., Kundrat, L., Ploegh, H.L. and Guimaraes, C.P. (2013). Site-specific N-terminal labeling of proteins using sortase-mediated reactions. *Nat Protoc* **8**, 1800–1807.
67. Swee, L.K., Guimaraes, C.P., Sehrawat, S., Spooner, E., Barrasa, M.I. and Ploegh, H.L. (2013). Sortase-mediated modification of α DEC205 affords optimization of antigen presentation and immunization against a set of viral epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 1428–1433.
68. Möhlmann, S., Mahlert, C., Greven, S., Scholz, P. and Harrenga, A. (2011). In vitro sort-tagging of an antibody fab fragment: overcoming unproductive reactions of sortase with water and lysine side chains. *Chembiochem* **12**, 1774–1780.
69. Williamson, D.J., Fascione, M.A., Webb, M.E. and Turnbull, W.B. (2012). Efficient N-terminal labeling of proteins by use of sortase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **124**, 9511–9514.
70. Chen, I., Dorr, B.M. and Liu, D.R. (2011). A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 11399–11404.
71. Huang, X., Aulabaugh, A., Ding, W., Kapoor, B., Alksne, L., Tabei, K. and Ellestad, G. (2003). Kinetic mechanism of *Staphylococcus aureus* sortase SrtA. *Biochemistry* **42**, 11307–11315.
72. Schmohl, L. and Schwarzer, D. (2014). Sortase-mediated ligations for the site-specific modification of proteins. *Curr Opin Chem Biol* **22**, 122–128.
73. Popp, M.W., Antos, J.M., Grotenbreg, G.M., Spooner, E. and Ploegh, H.L. (2007). Sortagging. A versatile method for protein labeling. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 707–708.
74. Lyon, R.P., Bovee, T.D., Doronina, S.O., Burke, P.J., Hunter, J.H., Neff-LaFord, H.D., Jonas, M., Anderson, M.E., Setter, J.R. and Senter, P.D. (2015). Reducing hydrophobicity

- of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* **33**, 733–735.
75. Bergmann, M. and Fraenkel-Conrat, H. (1938). The enzymatic synthesis of peptide bonds. *J. Biol. Chem.* **124**, 1–6.
76. Yagasaki, M. and Hashimoto, S.-i. (2008). Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 13–22.
77. Kumaran, S., Datta, D. and Roy, R.P. (2000). An enigmatic peptide ligation reaction. protease-catalyzed oligomerization of a native protein segment in neat aqueous solution. *Protein Sci.* **9**, 734–741.
78. Wehofsky, N. and Bordusa, F. (1999). Programming of enzyme specificity by substrate mimetics: investigations on the Glu-specific V8 protease reveals a novel general principle of biocatalysis. *FEBS Lett.* **443**, 220–224.
79. Yagisawa, S., Watanabe, S., Takaoka, T. and Azuma, H. (1990). High-efficiency transpeptidation catalysed by clostripain and electrostatic effects in substrate specificity. *Biochem. J.* **266**, 771–775.
80. Gunther, R., Stein, A. and Bordusa, F. (2000). Investigations on the enzyme specificity of clostripain. a new efficient biocatalyst for the synthesis of peptide isosteres. *J. Org. Chem.* **65**, 1672–1679.
81. Lewinska, M., Seitz, C., Skerra, A. and Schmidtchen, F.P. (2004). A novel method for the N-terminal modification of native proteins. *Bioconjug. Chem.* **15**, 231–234.
82. Jakubke, H. (1985). Basic Principles of Protease-Catalyzed Peptide Bond Formation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **24**, 85–93.
83. Bordusa, F. (2002). Proteases in organic synthesis. *Chem. Rev.* **102**, 4817–4868.
84. Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4524.
85. Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. (2000). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **28**, 323–325.
86. Bordusa, F. (2002). Substrate mimetics in protease catalysis. characteristics, kinetics, and synthetic utility. *Curr. Protein Pept. Sci.* **3**, 159–180.
87. Schellenberger, V. and Jakubke, H. (1991). Protease-Catalyzed Kinetically Controlled Peptide Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 1437–1449.
88. Bordusa, F., Ullmann, D., Elsner, C. and Jakubke, H. (1997). Substrate Mimetic Mediated Peptide Synthesis: an Irreversible Ligation Strategy That Is Independent of Substrate Specificity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**, 2473–2475.
89. Grunberg, R., Domgall, I., Gunther, R., Rall, K., Hofmann, H.J. and Bordusa, F. (2000). Peptide bond formation mediated by substrate mimetics. Structure-guided optimization of trypsin for synthesis. *Eur. J. Biochem.* **267**, 7024–7030.
90. Thormann, M., Thust, S., Hofmann, H.J. and Bordusa, F. (1999). Protease-catalyzed hydrolysis of substrate mimetics (inverse substrates). A new approach reveals a new mechanism. *Biochemistry* **38**, 6056–6062.
91. Bordusa, F. (2000). Nonconventional amide bond formation catalysis. programming enzyme specificity with substrate mimetics. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 469–485.
92. Bornscheuer, U.T. and Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 137–143.
93. Chica, R.A., Doucet, N. and Pelletier, J.N. (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity. combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 378–384.
94. Abrahamsén, L., Tom, J., Burnier, J., Butcher, K.A., Kossiakoff, A. and Wells, J.A. (1991). Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution. *Biochemistry* **30**, 4151–4159.

95. Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J. and Wells, J.A. (1994). A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues. *Science* **266**, 243–247.
96. Liebscher, S. (2007). *N- und C-terminale Modifizierung von Polypeptiden und Proteinen*. Dissertation (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
97. Liebscher, S., Schöpfel, M., Aumüller, T., Sharkhuukhen, A., Pech, A., Höss, E., Parthier, C., Jahreis, G., Stubbs, M.T. and Bordusa, F. (2014). N-terminal protein modification by substrate-activated reverse proteolysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 3024–3028.
98. Hedstrom, L. (1996). Trypsin. A case study in the structural determinants of enzyme specificity. *Biol. Chem.* **377**, 465–470.
99. Graf, L., Jancso, A., Szilagy, L., Hegyi, G., Pinter, K., Naray-Szabo, G., Hepp, J., Medzihradzky, K. and Rutter, W.J. (1988). Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4961–4965.
100. Rall, K. (2004). *Untersuchungen zur Optimierung der Serinprotease Trypsin für die Substratmimetika-vermittelte Peptidsynthese*. Dissertation (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
101. Kurth, T., Grahn, S., Thormann, M., Ullmann, D., Hofmann, H.J., Jakubke, H.D. and Hedstrom, L. (1998). Engineering the S1' subsite of trypsin. design of a protease which cleaves between dibasic residues. *Biochemistry* **37**, 11434–11440.
102. Willett, W.S., Brinen, L.S., Fletterick, R.J. and Craik, C.S. (1996). Delocalizing trypsin specificity with metal activation. *Biochemistry* **35**, 5992–5998.
103. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
104. Liebscher, S., Kornberger, P., Fink, G., Trost-Gross, E.-M., Höss, E., Skerra, A. and Bordusa, F. (2014). Derivatization of antibody Fab fragments: a designer enzyme for native protein modification. *Chembiochem* **15**, 1096–1100.
105. Meyer, C., Liebscher, S. and Bordusa, F. (2016). Selective Coupling of Click Anchors to Proteins via Trypsinligase. *Bioconjug. Chem.* **27**, 47–53.
106. Boersma, Y.L., Droge, M.J. and Quax, W.J. (2007). Selection strategies for improved biocatalysts. *FEBS J.* **274**, 2181–2195.
107. Johannes, T.W. and Zhao, H. (2006). Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 261–267.
108. Wang, M., Si, T. and Zhao, H. (2012). Biocatalyst development by directed evolution. *Bioresour. Technol.* **115**, 117–125.
109. Neylon, C. (2004). Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1448–1459.
110. Murakami, H., Hohsaka, T. and Sisido, M. (2002). Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat. Biotechnol.* **20**, 76–81.
111. El-Deiry, W.S., Downey, K.M. and So, A.G. (1984). Molecular mechanisms of manganese mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 7378–7382.
112. Zhao, H., Moore, J.C., Volkov, A.A. and Arnold, F.H. (1999). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution* (Washington DC/USA: ASM Press).
113. Cirino, P.C., Mayer, K.M. and Umeno, D. (2003). Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol. Biol.* **231**, 3–9.
114. Kayushin, A.L., Korosteleva, M.D., Miroshnikov, A.I., Kosch, W., Zubov, D. and Piel, N. (1996). A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites – syn-

- thons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3748–3755.
115. Sidhu, S.S. and Geyer, C.R. (2015). *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*, 2nd Edition (Boca Raton/USA: CRC Press).
 116. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.
 117. Stemmer, W.P. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10747–10751.
 118. Stemmer, W.P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389–391.
 119. Coco, W.M. (2003). RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates. *Methods Mol. Biol.* **231**, 111–127.
 120. Ostermeier, M. and Lutz, S. (2003). The creation of ITCHY hybrid protein libraries. *Methods Mol. Biol.* **231**, 129–141.
 121. Sen, S., Venkata Dasu, V. and Mandal, B. (2007). Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **143**, 212–223.
 122. Aguinaldo, A.M. and Arnold, F.H. (2003). Staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Methods Mol. Biol.* **231**, 105–110.
 123. Zhao, H. (2004). Staggered extension process in vitro DNA recombination. *Meth. Enzymol.* **388**, 42–49.
 124. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A. and Arnold, F.H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.* **16**, 258–261.
 125. Arnold, F.H. and Volkov, A.A. (1999). Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 54–59.
 126. Aharoni, A., Griffiths, A.D. and Tawfik, D.S. (2005). High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr Opin Chem Biol* **9**, 210–216.
 127. Fernandez-Gacio, A., Uguen, M. and Fastrez, J. (2003). Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol.* **21**, 408–414.
 128. Spencer, H. (1864). *The Principles of Biology: (V.1) (1864-67)* (Ithaca/USA: Cornell University Library).
 129. Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage. novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317.
 130. Clackson, T. and Lowmann, H.B. (2007). *Phage Display - practical approach* (Oxford/UK: Oxford University Press).
 131. Atwell, S. and Wells, J.A. (1999). Selection for improved subtiligases by phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9497–9502.
 132. Paschke, M. (2006). Phage display systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 2–11.
 133. Smith, G.P. and Petrenko, V.A. (1997). Phage Display. *Chem. Rev.* **97**, 391–410.
 134. Arap, M.A. (2005). Phage display technology - Applications and innovations. *Genet. Mol. Biol.* **28**, 1–9.
 135. Wang, C.I., Yang, Q. and Craik, C.S. (1996). Phage display of proteases and macromolecular inhibitors. *Meth. Enzymol.* **267**, 52–68.
 136. Rebar, E.J. and Pabo, C.O. (1994). Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. *Science* **263**, 671–673.
 137. Sieber, V., Plückthun, A. and Schmid, F.X. (1998). Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat. Biotechnol.* **16**, 955–960.
 138. Jung, S., Honegger, A. and Plückthun, A. (1999). Selection for improved protein stability by phage display. *J. Mol. Biol.* **294**, 163–180.

139. Gu, H., Yi, Q., Bray, S.T., Riddle, D.S., Shiau, A.K. and Baker, D. (1995). A phage display system for studying the sequence determinants of protein folding. *Protein Sci.* **4**, 1108–1117.
140. Jung, S. and Plückthun, A. (1997). Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. *Protein Eng.* **10**, 959–966.
141. Ruan, B., Hoskins, J., Wang, L. and Bryan, P.N. (1998). Stabilizing the subtilisin BPN' pro-domain by phage display selection: how restrictive is the amino acid code for maximum protein stability? *Protein Sci.* **7**, 2345–2353.
142. Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N. and Wells, J.A. (1991). Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* **30**, 10832–10838.
143. Tong, A.H.Y., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G.D., Brannetti, B., Castagnoli, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., et al. (2002). A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* **295**, 321–324.
144. Sidhu, S.S., Fairbrother, W.J. and Deshayes, K. (2003). Exploring protein-protein interactions with phage display. *Chembiochem* **4**, 14–25.
145. Teschke, T., Geltinger, B., Dose, A., Freund, C. and Schwarzer, D. (2013). Probing the recognition of post-translational modifications by combining sortase-mediated ligation and phage-assisted selection. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1692–1697.
146. Hoess, R.H. (2001). Protein design and phage display. *Chem. Rev.* **101**, 3205–3218.
147. Forrer, P., Jung, S. and Pluckthun, A. (1999). Beyond binding. using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 514–520.
148. Corey, D.R., Shiau, A.K., Yang, Q., Janowski, B.A. and Craik, C.S. (1993). Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene* **128**, 129–134.
149. Heinis, C., Huber, A., Demartis, S., Bertschinger, J., Melkko, S., Lozzi, L., Neri, P. and Neri, D. (2001). Selection of catalytically active biotin ligase and trypsin mutants by phage display. *Protein Eng.* **14**, 1043–1052.
150. Corey, D.R., Willett, W.S., Coombs, G.S. and Craik, C.S. (1995). Trypsin specificity increased through substrate-assisted catalysis. *Biochemistry* **34**, 11521–11527.
151. Kornberger, P. and Skerra, A. (2014). Sortase-catalyzed in vitro functionalization of a HER2-specific recombinant Fab for tumor targeting of the plant cytotoxin gelonin. *MAbs* **6**, 354–366.
152. Paschke, M., Zahn, G., Warsinke, A. and Hohne, W. (2001). New series of vectors for phage display and prokaryotic expression of proteins. *BioTechniques* **30**, 720–4, 726.
153. Hilpert, K., Hansen, G., Wessner, H., Küttner, G., Welfle, K., Seifert, M. and Höhne, W. (2001). Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng.* **14**, 803–806.
154. Schmidt, T.G.M. and Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528–1535.
155. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (2012). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 4th Edition (Cold Spring Harbor/USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
156. Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R. and Marillonnet, S. (2009). Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS ONE* **4**, e5553.
157. Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A. and Martin, M.A. (2006). *Virology*, 5th revised Edition (Philadelphia/USA: Lippincott Williams & Wilki).
158. Tang, J.X., Janmey, P.A., Lyubartsev, A. and Nordenskiöld, L. (2002). Metal ion-induced lateral aggregation of filamentous viruses fd and M13. *Biophys. J.* **83**, 566–581.
159. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

160. Lambert B.L and Meyer T.S. (1965). Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144–145.
161. Gill, S.C. and von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.
162. Park, S.J and Cochran, J.R. (2009). *Protein Engineering and Design*, 1st Edition (Boca Raton/USA: CRC Press).
163. Jacobs, M., Wnendt, S. and Stahl, U. (1990). High-efficiency electro-transformation of *Escherichia coli* with DNA from ligation mixtures. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1653.
164. Kurth, T., Ullmann, D., Jakubke, H.D. and Hedstrom, L. (1997). Converting trypsin to chymotrypsin. structural determinants of S1' specificity. *Biochemistry* **36**, 10098–10104.
165. Radisky, E.S., Lee, J.M., Lu, C.J. and Koshland, D.E., Jr. (2006). Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6835–6840.
166. Helland, R., Otlewski, J., Sundheim, O., Dadlez, M. and Smalas, A.O. (1999). The crystal structures of the complexes between bovine beta-trypsin and ten P1 variants of BPTI. *J. Mol. Biol.* **287**, 923–942.
167. Hubert, R. and Bode, W. (1977). Structural Basis of the Activation and Action of Trypsin. *Acc. Chem. Res.* **11**, 114–122.
168. Stubbs, M.T., Reyda, S., Dullweber, F., Möller, M., Klebe, G., Dorsch, D., Mederski, W.W. and Wurziger, H. (2002). pH-dependent binding modes observed in trypsin crystals: lessons for structure-based drug design. *Chembiochem* **3**, 246–249.
169. Kossiakoff, A.A., Shpungin, J. and Sintchak, M.D. (1990). Hydroxyl hydrogen conformations in trypsin determined by the neutron diffraction solvent difference map method: relative importance of steric and electrostatic factors in defining hydrogen-bonding geometries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4468–4472.
170. Brandsdal, B.O., Smalas, A.O. and Aqvist, J. (2006). Free energy calculations show that acidic P1 variants undergo large pKa shifts upon binding to trypsin. *Proteins* **64**, 740–748.
171. Vasquez, J.R., Evin, L.B., Higaki, J.N. and Craik, C.S. (1989). An expression system for trypsin. *J. Cell. Biochem.* **39**, 265–276.
172. Alberts, B. et al. (2012). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 4th Edition (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).
173. Hedstrom, L., Lin, T.Y. and Fast, W. (1996). Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry* **35**, 4515–4523.
174. Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B.L. and Georgiou, G. (2001). Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* *trx*B gor mutants via the coexpression of molecular chaperones. *Protein Expr. Purif.* **23**, 338–347.
175. Wulfig, C. and Pluckthun, A. (1994). Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**, 685–692.
176. Lei, S.P., Lin, H.C., Wang, S.S., Callaway, J. and Wilcox, G. (1987). Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. *J. Bacteriol.* **169**, 4379–4383.
177. Natale, P., Brüser, T. and Driessen, A.J. (2007). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1735–1756.
178. Thie, H., Schirrmann, T., Paschke, M., Dubel, S. and Hust, M. (2008). SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in *E. coli*. *N Biotechnol* **25**, 49–54.
179. Kay, B.K., Winter, J. and McCafferty, J. (1996). *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual* (London/UK: Academic Press).

180. Hauser, P.S. and Ryan, R.O. (2007). Expressed protein ligation using an N-terminal cysteine containing fragment generated in vivo from a pelB fusion protein. *Protein Expr. Purif.* **54**, 227–233.
181. Schlegel, H.G. and Fuchs, G. (2006). *Allgemeine Mikrobiologie*, 8th Edition (Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG).
182. Singaravelan, B., Roshini, B.R. and Munavar, M.H. (2010). Evidence that the supE44 mutation of *Escherichia coli* is an amber suppressor allele of glnX and that it also suppresses ochre and opal nonsense mutations. *J. Bacteriol.* **192**, 6039–6044.
183. Krebber, A., Burmester, J. and Plückthun, A. (1996). Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene* **178**, 71–74.
184. Braud, S., Moutiez, M., Belin, P., Abello, N., Drevet, P., Zinn-Justin, S., Courçon, M., Masson, C., Dassa, J., Charbonnier, J.-B., et al. (2005). Dual expression system suitable for high-throughput fluorescence-based screening and production of soluble proteins. *J. Proteome Res.* **4**, 2137–2147.
185. Eggertsson, G. and Söll, D. (1988). Transfer ribonucleic acid-mediated suppression of termination codons in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **52**, 354–374.
186. Yin, J., Mills, J. and Schultz, P. (2004). A Catalysis-Based Selection for Peroxidase Antibodies with Increased Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3006–3007.
187. Hughes, M.D., Nagel, D.A., Santos, A.F., Sutherland, A.J. and Hine, A.V. (2003). Removing the redundancy from randomised gene libraries. *J. Mol. Biol.* **331**, 973–979.
188. Tang, L., Gao, H., Zhu, X., Wang, X., Zhou, M. and Jiang, R. (2012). Construction of "small-intelligent" focused mutagenesis libraries using well-designed combinatorial degenerate primers. *BioTechniques* **52**, 149–158.
189. Legendre, D., Laraki, N., Gräslund, T., Bjørnvad, M.E., Bouchet, M., Nygren, P.A., Borchert, T.V. and Fastrez, J. (2000). Display of active subtilisin 309 on phage: analysis of parameters influencing the selection of subtilisin variants with changed substrate specificity from libraries using phosphorylating inhibitors. *J. Mol. Biol.* **296**, 87–102.
190. Vanwetswinkel, S., Avalle, B. and Fastrez, J. (2000). Selection of beta-lactamases and penicillin binding mutants from a library of phage displayed TEM-1 beta-lactamase randomly mutated in the active site omega-loop. *J. Mol. Biol.* **295**, 527–540.
191. Widersten, M. and Mannervik, B. (1995). Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. *J. Mol. Biol.* **250**, 115–122.
192. Cesaro-Tadic, S., Lagos, D., Honegger, A., Rickard, J.H., Partridge, L.J., Blackburn, G.M. and Plückthun, A. (2003). Turnover-based in vitro selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library. *Nat. Biotechnol.* **21**, 679–685.
193. Betley, J.R., Cesaro-Tadic, S., Mekhafia, A., Rickard, J.H., Denham, H., Partridge, L.J., Plückthun, A. and Blackburn, G.M. (2002). Direct screening for phosphatase activity by turnover-based capture of protein catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 775–777.
194. Pedersen, H., Hölder, S., Sutherlin, D.P., Schwitter, U., King, D.S. and Schultz, P.G. (1998). A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 10523–10528.
195. Ponsard, I., Galleni, M., Soumillion, P. and Fastrez, J. (2001). Selection of metalloenzymes by catalytic activity using phage display and catalytic elution. *Chembiochem* **2**, 253–259.
196. Demartis, S., Huber, A., Viti, F., Lozzi, L., Giovannoni, L., Neri, P., Winter, G. and Neri, D. (1999). A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **286**, 617–633.
197. Piotukh, K., Geltinger, B., Heinrich, N., Gerth, F., Beyermann, M., Freund, C. and Schwarzer, D. (2011). Directed evolution of sortase A mutants with altered substrate selectivity profiles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17536–17539.

198. Tang, J.X., Wong, S., Tran, P.T. and Janmey, P.A. (2010). Counterion induced bundle formation of rodlike polyelectrolytes. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **100**, 796–806.
199. Shinohara, N. and Fukuda, H. (2002). Isolation of monoclonal antibodies recognizing rare and dominant epitopes in plant vascular cell walls by phage display subtraction. *J. Immunol. Methods* **264**, 187–194.
200. Suzuki, Y., Ito, S., Otsuka, K., Iwasawa, E., Nakajima, M. and Yamaguchi, I. (2005). Preparation of functional single-chain antibodies against bioactive gibberellins by utilizing randomly mutagenized phage-display libraries. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 610–619.
201. Govarts, C., Somers, K., Stinissen, P. and Somers, V. (2010). Frameshifting in the p6 cDNA phage display system. *Molecules* **15**, 9380–9390.
202. Brown, W.C. and Campbell, J.L. (1993). A new cloning vector and expression strategy for genes encoding proteins toxic to *Escherichia coli*. *Gene* **127**, 99–103.
203. Wulfing, C. and Pluckthun, A. (1993). A versatile and highly repressible *Escherichia coli* expression system based on invertible promoters. expression of a gene encoding a toxic product. *Gene* **136**, 199–203.
204. Kibota, T.T. and Lynch, M. (1996). Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*. *Nature* **381**, 694–696.
205. Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H. and Cohen, S.N. (2004). SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* **305**, 1629–1631.
206. Ge, A.Z., Pfister, R.M. and Dean, D.H. (1990). Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*. properties of the product. *Gene* **93**, 49–54.
207. Inokuchi, H., Kodaira, M., Yamao, F. and Ozeki, H. (1979). Identification of transfer RNA suppressors in *Escherichia coli*. II. Duplicate genes for tRNA^{2Gln}. *J. Mol. Biol.* **132**, 663–677.
208. de Boer, H.A., Comstock, L.J. and Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 21–25.
209. Zahn, G., Skerra, A. and Höhne, W. (1999). Investigation of a tetracycline-regulated phage display system. *Protein Eng.* **12**, 1031–1034.
210. Goldman, E., Korus, M. and Mandecki, W. (2000). Efficiencies of translation in three reading frames of unusual non-ORF sequences isolated from phage display. *Faseb J.* **14**, 603–611.
211. Carcamo, J., Ravera, M.W., Brissette, R., Dedova, O., Beasley, J.R., Alam-Moghe, A., Wan, C., Blume, A. and Mandecki, W. (1998). Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 11146–11151.
212. Griffith, A.J.F. et. al (2004). *An Introduction to Genetic Analysis*, 8th Edition (New York/USA: W.H. Freeman and Company).
213. Alfred Schellenberger (1989). *Enzymkatalyse*, 1st Edition (Jena: Gustav Fischer Verlag).
214. Darby, N.J. and Creighton, T.E. (1993). *Protein Structure*, 1st Edition (Oxford/UK: Oxford University Press).
215. Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132.
216. Meyer, E.A., Castellano, R.K. and Diederich, F. (2003). Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 1210–1250.
217. Kurth, T., Ullmann, D., Jakubke, H.D. and Hedstrom, L. (1997). Converting trypsin to chymotrypsin: structural determinants of S1' specificity. *Biochemistry* **36**, 10098–10104.

218. Hedstrom, L., Szilagyi, L. and Rutter, W.J. (1992). Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* **255**, 1249–1253.
219. Zanetti-Domingues, L.C., Tynan, C.J., Rolfe, D.J., Clarke, D.T. and Martin-Fernandez, M. (2013). Hydrophobic fluorescent probes introduce artifacts into single molecule tracking experiments due to non-specific binding. *PLoS ONE* **8**, e74200.
220. Sipos, T. and Merkel, J.R. (1968). Temperature-dependent activation of trypsin by calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 522–527.
221. Sipos, T. and Merkel, J.R. (1970). An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* **9**, 2766–2775.
222. Bode, W. and Schwager, P. (1975). The single calcium-binding site of crystallin bovin beta-trypsin. *FEBS Lett.* **56**, 139–143.
223. Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978). Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 251–276.
224. Northrop, J.H. and Kunitz, M. (1932). CRYSTALLINE TRYPSIN. II. GENERAL PROPERTIES. *J. Gen. Physiol.* **16**, 295–311.
225. Colloch, N. and Cohen, F.E. (1991). Beta-breakers: an aperiodic secondary structure. *J. Mol. Biol.* **221**, 603–613.
226. Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1977). Beta-turns in proteins. *J. Mol. Biol.* **115**, 135–175.
227. Brinen, L.S., Willett, W.S., Craik, C.S. and Fletterick, R.J. (1996). X-ray structures of a designed binding site in trypsin show metal-dependent geometry. *Biochemistry* **35**, 5999–6009.
228. Gombos, L., Kardos, J., Patthy, A., Medveczky, P., Szilagyi, L., Malnasi-Csizmadia, A. and Graf, L. (2008). Probing conformational plasticity of the activation domain of trypsin. the role of glycine hinges. *Biochemistry* **47**, 1675–1684.
229. Williamson, M.P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**, 249–260.
230. Morris, A.L., MacArthur, M.W., Hutchinson, E.G. and Thornton, J.M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **12**, 345–364.
231. Gilles, A.M., Saint-Girons, I., Monnot, M., Femandjian, S., Michelson, S. and Bârză, O. (1986). Substitution of a serine residue for proline-87 reduces catalytic activity and increases susceptibility to proteolysis of *Escherichia coli* adenylate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5798–5802.
232. Lide, D. (1991). *Handbook of Chemistry and Physics*, 72nd Edition Edition (Boca Raton/USA: CRC Press).
233. Fändrich, M. and Dobson, C.M. (2002). The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* **21**, 5682–5690.

Danksagung

Prof. Dr. Frank Bordusa danke ich für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie für das Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Dr. Sandra Liebscher danke ich für die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie für das Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und das Korrekturlesen der Dissertationsschrift. Weiterhin danke ich ihr für die Klonierung, Expression und Reinigung des anti-TNF α Fab-Fragmentes sowie für die experimentelle Durchführung der Modifizierung des Fab-Fragmentes.

Dr. Sven Pfeifer und *Dr. Li Yuan* danke ich für die stete Unterstützung auf dem Gebiet des *Phage Displays* und die stete Diskussionsbereitschaft sowie für die Bereitstellung von Laborausrüstung, Protokollen und Materialien.

Dr. Bianka Hartradt, Christoph Meyer, Lars Franke und *Steffanie Kaufmann* danke ich für die Bereitstellung von Peptiden und Substraten. *Christa Langer* danke ich für die vielfältige und tatkräftige technische Unterstützung. *Dr. Angelika Schierhorn* und *Christina Gersching* danke ich für massenspektrometrische Analysen. Der *Arbeitsgruppe Frank Bordusa* danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen.

Scil Proteins GmbH (Halle/Saale) danke ich für die Überlassung des pSCIL-Vektors.

EUCODIS Bioscience GmbH (Wien) danke ich für die finanzielle Unterstützung und für das rege Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Christoph Meyer danke ich weiterhin für seine Freundschaft, die vielen gewinnbringenden und interessanten Diskussionen sowie für die gemeinsame Zeit in Halle – ich werde mich immer wieder gerne daran erinnern. Meinen Freunden danke ich für das Verständnis für die viele Zeit, die ich im Labor und am Schreibtisch verbracht habe und für die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft in allen Lebenslagen. *Dr. Nicole Wehowsky, Dr. Alexander Weber, Christina Schmitz* und *Thomas Uhlemann* danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein inniger Dank richtet sich an meine Eltern, deren uneingeschränkter Unterstützung ich mir immer Gewiss sein konnte, die mir in allen Lebenslagen eine große Stütze waren und die mich durch unzählige fruchtbare Diskussionen während der gesamten Zeit begleitet haben.

Angaben zur Person

Familienname	Gissel
Vorname	Sabrina
Vorhandener akademischer Grad	Diplom-Biochemikerin
Geburtsdatum/-ort	04.11.1983 in Bad Hersfeld
Geschlecht	weiblich
Wohnsitz und Korrespondenzanschrift	Marktstraße 5, 36280 Oberaula
Staatsangehörigkeit	deutsch
Fachgebiet der Promotion	Biochemie

Wissenschaftlicher Werdegang

10/2003–07/2008	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2007–06/2008	Anfertigung der Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Thema: „Studien zum Einfluss hydrophober Aminosäurereste im aktiven Zentrum von Trypsin auf die Hydrolyseaktivität“
28.07.2008	Ablage der Diplomprüfung für den Studiengang Biochemie
08/2008–12/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V – Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle (Saale)
01/2009–03/2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Anfertigung der Promotionsarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Frank Bordusa mit dem Thema: „Etablierung des <i>Phage Display</i> -Verfahrens für die Optimierung der Trypsinligase“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Oberaula, den _____

Sabrina Gissel

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfsmittel verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht verwendet. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Dissertation eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich mich auch mit keiner anderen Arbeit zur Erlangung des akademischen Doktorgrades beworben habe.

Oberaula, den _____

Sabrina Gissel