

Lars Franke

# Von der Protease zur Peptidsynthase

Der Einfluss des Oxyanion-Lochs auf  
die reverse Proteolyse am Beispiel  
von Trypsin



Springer Spektrum

---

# Von der Protease zur Peptidsynthese

---

Lars Franke

# Von der Protease zur Peptidsynthase

Der Einfluss des Oxyanion-Lochs auf  
die reverse Proteolyse am Beispiel  
von Trypsin



**Springer** Spektrum

Lars Franke  
AG Naturstoffbiochemie  
MLU Halle-Wittenberg  
Halle, Deutschland

Zugl.: Dissertation, MLU Halle-Wittenberg, 2019

ISBN 978-3-658-30436-2      ISBN 978-3-658-30437-9 (eBook)  
<https://doi.org/10.1007/978-3-658-30437-9>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, ein Teil von Springer Nature 2020

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag, noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

*"Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen, sondern mit den Augen die Tür zu finden."*  
(Werner von Siemens (1816 - 1892))

# Vorwort und Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen einer ordentlichen Promotion in der Abteilung Naturstoffbiochemie von Prof. Dr. Frank Bordusa an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und war ein Teilprojekt innerhalb des Landesexzellenznetzwerkes „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“.

Die Idee, Proteasen für die enzymkatalysierte Peptidsynthese einzusetzen, wurde bereits 1898 von VAN'T HOFF aufgrund der mikroskopischen Reversibilität der Reaktion postuliert. Diese These konnte 1937 von BERGMAN experimentell bestätigt werden. Wenn gleich die enzymatische Peptidsynthese durch Proteasen möglich ist und Proteasen eine hervorragende Interaktion mit dem Peptidrückgrat aufweisen, so stellen diese Enzyme keine idealen Katalysatoren für diese Reaktion, aufgrund ihrer natürlichen Funktion, dar.

Auf der Suche nach alternativen Enzymen für die enzymatische Peptidsynthese konnte die Thioesterase als potentieller Kandidat identifiziert werden. Diese Enzym eignet sich hervorragend für die Peptidbindungsknüpfung und ist sowohl strukturell als auch mechanistisch mit den Serinproteasen verwandt. Dennoch ist auch diese Enzym nur bedingt für die Synthese einsetzbar da die Substraterkennung strukturell begrenzt ist.

Eine Kombination der Vorteile aus Protease und Thioesterase schien sinnvoll und wurde in dieser Arbeit betrachtet, um für die enzymatische Peptidsynthese neuartige und wirkungsvolle Katalysatoren zur Verfügung zu stellen.

Das Zustandekommen dieser Arbeit habe ich einer Vielzahl von Leuten zu verdanke, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Besonderer Dank gilt dabei den folgenden Personen:

- Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Frank Bordusa für die Unterstützung, das kritische Hinterfragen und die gewährten Freiheiten.
- Prof. Gunter Fischer danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und das resolute Nachfragen zum Abschluss meiner Arbeit.
- Dr. Markus Liebscher habe ich für die Unterstützung bei den CD-Spektren, der Klonierung, den PPIase-Messungen und der äußerst kritischen Hinterfragung aller Ergebnisse zu danken.
- Ebenso hab ich Dr. Sandra Liebscher für die Überlassung von Vektoren, das Korrekturlesen meiner Arbeit und entscheidenden kritischen Anmerkungen zu *N*-Terminale Modifizierung von Parvulin 10 zu danken.
- André Diessner habe ich für eine ganze Reihe von Dingen zu danken. Da wäre zum einen die Kooperation bei den Peptidsynthesen, die Unterstützung im Labor, die Hilfe bei der Reinigung des Parvulin 10 und dem Korrekturlesen meiner Arbeit, sowie den reichlich vorhandenen Kaffeepausen.

- Für die Überlassung von Substanzen, sowie Anmerkungen zu Synthesen danke ich Dr. Andreas Pech, Dr. Nicole Wehofsky, Christoph Meyer, Dr. Ilona Born und Dr. Bianca Hardtrodt.
- Andreas Simon danke ich für die Überlassung von Vektoren und Trypsin E80C.
- Für den Vergleich der PDB-Daten der Übergangszustände von Substraten, Substratanalogen und Inhibitoren im aktivem Zentrum von Trypsin danke ich PD Dr. Iris Thondorf.
- PD Dr. Golbik danke ich für die kritischen Anmerkungen zu meinen Arbeiten.
- AG-Wahle gilt mein Dank für den zur Nutzung überlassenen Fluoreszenzscanner, hier im besonderen Mario Fiedler und Dr. Uwe Kühn.
- AG-Schwarz danke ich für das zur Nutzung überlassenen CD-Spektrometers.
- Dem Landesexzellenznetzwerk „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“ danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.
- Zu guter Letzt möchte ich mich noch für die Geduld und Unterstützung bei meinen Freunden, meinen Eltern sowie bei meiner Familie bedanken.

Lars Franke

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> . . . . .	<b>XIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> . . . . .	<b>XV</b>
<b>Reaktionsschemata</b> . . . . .	<b>XVII</b>
<b>Nomenklatur</b> . . . . .	<b>XIX</b>
<b>Teil I</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b> . . . . .	<b>3</b>
1.1 Die natürliche Proteinbiosynthese . . . . .	3
1.2 Anthropogene Proteinsynthese . . . . .	4
1.2.1 Peptidsynthese und deren chemische Ligation . . . . .	4
1.2.2 Enzymatische Ligationsverfahren . . . . .	6
1.3 Vorstellung des Konzepts . . . . .	14
<b>2 Zielstellung</b> . . . . .	<b>19</b>
<b>Teil II</b> . . . . .	<b>21</b>
<b>3 Theoretischer Teil</b> . . . . .	<b>23</b>
3.1 Überexpression und Reinigung der Varianten . . . . .	23
3.1.1 Generierung der Trypsinvarianten auf DNA-Ebene . . . . .	23
3.1.2 Überexpression und Reinigung . . . . .	23
3.1.3 Analytik . . . . .	26
3.2 Untersuchung zur Struktur der Trypsinvarianten . . . . .	28
3.2.1 Disulfidverbrückung . . . . .	30
3.2.2 Sekundärstruktur . . . . .	31
3.3 Enzymatische Charakterisierung . . . . .	32
3.3.1 Hydrolysestudien . . . . .	33
3.3.2 Bestimmung kinetischer Konstanten . . . . .	34
3.3.3 Berechnung der Änderungen der Energie der Übergangszustände . . . . .	35
3.3.4 Bestimmung des Effizienzparameters . . . . .	37
3.3.5 Kinetische Parameter der Acyltransferreaktion . . . . .	40
3.3.6 Proteinmodifizierung . . . . .	41
<b>Teil III</b> . . . . .	<b>43</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> . . . . .	<b>45</b>
4.1 Generierung und Reinigung der Trypsinvarianten . . . . .	45
4.1.1 Generierung der Trypsinvarianten auf DNA-Ebene . . . . .	45
4.1.2 Expression und Reinigung . . . . .	45
4.2 Untersuchung der Struktur . . . . .	52
4.2.1 Disulfidverbrückung . . . . .	52



4.2.2	Sekundärstruktur . . . . .	54
4.3	Enzymatische Charakterisierung . . . . .	59
4.3.1	Hydrolysestudien . . . . .	59
4.3.2	Initiale Hydrolysegeschwindigkeit . . . . .	61
4.3.3	Bestimmung kinetischer Konstanten für ausgewählte Substrate . . . . .	67
4.3.4	Energieberechnung der Übergangszustände . . . . .	69
4.3.5	Bestimmung des Effizienzparameters . . . . .	80
4.3.6	Kinetische Parameter der Acyltransferreaktion . . . . .	83
4.3.7	Proteinmodifizierung . . . . .	90
4.3.8	Vor- und Nachteile gegenüber anderen Modifizierungsreaktionen . . . . .	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung . . . . .</b>	<b>95</b>
	<b>Literaturverzeichnis . . . . .</b>	<b>99</b>
	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>119</b>
<b>A</b>	<b>Material . . . . .</b>	<b>123</b>
A.1	Chemikalien . . . . .	123
A.2	Enzyme . . . . .	123
A.3	Molekularbiologische Kits . . . . .	124
A.4	Längenstandard/Molekülmassenstandard . . . . .	124
A.5	Stämme . . . . .	124
A.6	Nukleotide und Oligonukleotide . . . . .	125
A.7	Vektoren . . . . .	125
A.8	Kulturmedien . . . . .	126
A.9	Antibiotika . . . . .	126
A.10	Geräte und Zubehör . . . . .	127
A.11	Datenverarbeitung . . . . .	128
<b>B</b>	<b>Methoden . . . . .</b>	<b>129</b>
B.1	Chemische Synthesen . . . . .	129
B.1.1	Darstellung von Aminosäureestern der allgemeinen Struktur Bz-Xaa-OMe . . . . .	129
B.1.2	Darstellung der Verbindungen Z-K-S-Me, Z-K-O-Me und Z-K-NH-Me . . . . .	129
B.1.3	Darstellung des Aminosäureesters der Struktur Bz-G-OGp . . . . .	130
B.1.4	Darstellung der Peptide der allgemeinen Struktur vom Typ MAA-Xaa-AG und MAAAG . . . . .	130
B.1.5	Darstellung der Peptidester FAM-AAK-S-Me und Abz-AAK-OMe . . . . .	131
B.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	131
B.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	131
B.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	131
B.3.2	Coomassie-Färbung . . . . .	132
B.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	132
B.3.4	Expression und Reinigung der Trypsinvarianten . . . . .	132
B.3.5	Bestimmung der Aktivität von Trypsin . . . . .	132
B.3.6	Chromatographische und massenspektrometrische Analysen . . . . .	133
B.3.7	Titration mit ELLMAN'S-Reagenz . . . . .	133

---

B.3.8	CD-Spektren . . . . .	133
B.3.9	Bestimmung kinetischer Parameter . . . . .	134
B.3.10	Modifizierung von Parvulin 10 . . . . .	136
<b>C</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>137</b>
C.1	Liste Ester und Peptide . . . . .	137
C.2	Sequenzen . . . . .	139
C.2.1	Nukleotidsequenzen der Trypsinvarianten . . . . .	139
C.2.2	Aminosäuresequenzen der Trypsinvarianten . . . . .	142
C.2.3	Aminosäuresequenzen von Parvulin10 und Varianten . . . . .	143
C.2.4	Vektoren . . . . .	143
C.3	Massenspektren und Chromatogramme . . . . .	144
C.3.1	Massenspektren der generierten Trypsinvarianten . . . . .	144
C.3.2	Massenspektren vom Parvulin 10 und dessen Varianten . . . . .	145
C.3.3	Chromatogramme der generierten Trypsinvarianten . . . . .	146
C.4	Sekundärstruktur der Trypsinvarianten . . . . .	147
C.5	Effizienzparameter der Trypsinvarianten . . . . .	148
C.5.1	Effizienzparameter beim Acyltransfer auf Aminosäureamide . . . . .	148
C.5.2	Effizienzparameter beim Acyltransfer auf Pentapeptide . . . . .	150
C.6	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Bestimmung der modifizierten Parvulin 10-Varianten . . . . .	151
C.7	Schemata der Übergangszustände von Trypsin katalysierten Reaktionen . . . . .	152
<b>Index</b>	<b>. . . . .</b>	<b>155</b>
<b>Publikation</b>	<b>. . . . .</b>	<b>159</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Einleitung - Schema der Festphasenpeptidsynthese . . . . .	5
1.2	Einleitung - Schema des Substratmimetikakonzeptes . . . . .	9
1.3	Einleitung - Schema der Funktion der GramcidinS-Synthetase . . . . .	12
1.4	Einleitung - Relative Energien der Übergangszustände . . . . .	15
1.5	Einleitung - Vergleich: Aktives Zentrum Thioesterase - Trypsin . . . . .	16
1.6	Einleitung - Oxyanion-Loch . . . . .	17
3.1	Theoretischer Teil - Übersicht der durchzuführenden Arbeiten . . . . .	25
3.2	Theoretischer Teil - Strukturbereich des Trypsins mit möglichen Veränderungen in den Trypsinvarianten . . . . .	30
4.1	Ergebnisse und Diskussion - SDS-PAGE der Reinigungsschritte . . . . .	46
4.2	Ergebnisse und Diskussion- Erhebung der Daten zur Bestimmung der aktiven Trypsinmenge . . . . .	50
4.3	Ergebnisse und Diskussion - SDS-PAGE der Trypsinvarianten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen . . . . .	53
4.4	Ergebnisse und Diskussion - Anionisches Rattentrypsin II mit Disulfidbrücken	54
4.5	Ergebnisse und Diskussion - CD-Spektren . . . . .	55
4.6	Ergebnisse und Diskussion - Reaktivität von Carbonsäurederivaten . . . . .	64
4.7	Ergebnisse und Diskussion - Abgangsgruppen von Substratmimetika . . . . .	66
4.8	Ergebnisse und Diskussion - Vereinfachtes Modell der Kinetik und Thermodynamik der Hydrolysereaktion durch Trypsin . . . . .	74
4.9	Ergebnisse und Diskussion - Funktionsmodell der Wasserstoffbrücken im Oxyanion-Loch . . . . .	77
4.10	Ergebnisse und Diskussion - Effizienz des Acyltransfer von Aminosäureamiden	81
4.11	Ergebnisse und Diskussion - Effizienz des Acyltransfer auf Pentapeptide . . . . .	82
4.12	Ergebnisse und Diskussion - Untersuchung zur Sekundärhydrolyse ausgewählter Acyltransferreaktionen. . . . .	89
4.13	Ergebnisse und Diskussion - Kinetik der Modifizierung von MAParvulin 10.	91
4.14	Ergebnisse und Diskussion - Modifizierung von MAParvulin 10 . . . . .	92
C.1	Anhang - Nukleotidsequenzen der Trypsinvarianten . . . . .	139
C.2	Anhang - Aminosäuresequenzen der Trypsinvarianten . . . . .	142
C.3	Anhang - Aminosäuresequenzen der Parvuline . . . . .	143
C.4	Anhang - Vektoren: pST und pYT . . . . .	143
C.5	Anhang - Massenspektren der generierten Trypsinvarianten. . . . .	144
C.6	Anhang - Massenspektren der modifizierten Par10-Varianten. . . . .	145
C.7	Anhang - Chromatogramme der Trypsinvarianten . . . . .	146
C.8	Anhang - Berechnung der theoretischen Sekundärstrukturelemente . . . . .	147

C.9 Anhang - Untersuchungen der Aktivität der modifizierten Parvulin10-Varianten. . . . .	151
C.10 Anhang - Schematische Darstellung der Übergangszustände . . . . .	152

# Tabellenverzeichnis

1.1	Einleitung - Beispiele für Substratmimetika . . . . .	10
4.1	Ergebnisse und Diskussion - Reinigung der Trypsinvarianten . . . . .	47
4.2	Ergebnisse und Diskussion - Vergleich der Bestimmungen der aktiven Trypsinspezies . . . . .	51
4.4	Ergebnisse und Diskussion - Gehalt an freien Thiolen in den Trypsinvarianten	52
4.6	Ergebnisse und Diskussion - Sekundärstrukturen . . . . .	56
4.8	Ergebnisse und Diskussion - pH-Optimum . . . . .	60
4.10	Ergebnisse und Diskussion - initiale Hydrolysegeschwindigkeiten für Standardsubstrate . . . . .	62
4.12	Ergebnisse und Diskussion - initiale Hydrolysegeschwindigkeiten für ausgewählte Carbonsäurederivate . . . . .	63
4.14	Ergebnisse und Diskussion - initiale Hydrolysegeschwindigkeiten für ausgewählte Substratmimetika . . . . .	65
4.16	Ergebnisse und Diskussion - Relative initiale Hydrolysegeschwindigkeiten .	66
4.18	Ergebnisse und Diskussion - Bestimmung kinetischer Parameter . . . . .	68
4.19	Ergebnisse und Diskussion - Differenzen der Bindungsenergien der Trypsinvarianten im Vergleich zum <i>wt</i> -Trypsin . . . . .	70
4.21	Ergebnisse und Diskussion - Differenzen der Acylierungsenergien der Trypsinvariante im Vergleich zum <i>wt</i> -Trypsin . . . . .	71
4.23	Ergebnisse und Diskussion - Differenz der Deacylierungsenergie der Trypsinvarianten im Vergleich zum <i>wt</i> -Trypsin . . . . .	72
4.25	Ergebnisse und Diskussion - Liste der verglichenen Kristallstrukturen . . .	75
4.27	Ergebnisse und Diskussion - Kinetische Parameter der Acyltransferreaktionen	84
4.28	Ergebnisse und Diskussion - Maximale Aminolysegeschwindigkeiten . . . .	85
4.29	Ergebnisse und Diskussion - Maximale Aminolysegeschwindigkeiten unter nicht sättigenden Bedingungen . . . . .	88
A.1	MuM - Enzyme . . . . .	123
A.3	MuM - Molekularbiologische Kits . . . . .	124
A.5	MuM - Längenstandard/Molekülmassenstandard . . . . .	124
A.7	MuM - Stämme . . . . .	124
A.9	MuM - Oligonukleotide . . . . .	125
A.11	MuM - Vektoren . . . . .	125
A.13	MuM - Kulturmedien . . . . .	126
A.15	MuM - Antibiotika . . . . .	126
A.17	MuM - Verwendete Geräte . . . . .	127
A.19	MuM - Software . . . . .	128
A.21	MuM - Verwendete Internetseiten . . . . .	128

C.1	Anhang - Liste Ester und Peptide . . . . .	137
C.3	Anhang - Acyltransfer-Aminosäureamide . . . . .	148
C.4	Anhang - Acyltransfer-Aminosäureamide . . . . .	150
C.5	Anhang - Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren . . . . .	153

# Reaktionsschemata

1.1	Einleitung - Mechanistisches Modell der thermodynamisch kontrollierten reversen Proteolyse . . . . .	6
1.2	Einleitung - Mechanistisches Modell der kinetisch kontrollierten, reversen Proteolyse . . . . .	7
3.1	Einleitung - Mechanistisches Modell der kinetisch kontrollierten Hydrolyse durch Serinproteasen . . . . .	28

# Nomenklatur

5/6-FAM 5/6-Carboxyfluorescein

*aqua bidest* doppelt destilliertes Wasser

Abz Aminobenzoesäure

ADH Alkoholdehydrogenase

ATP Adenosintriphosphat

Boc tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe

BPTI Basischer Pankreas Trypsin Inhibitor

Bz Benzoessäure

bzw. beziehungsweise

CAIBE Chlorameisensäure-iso-butylester

CD Circular dichroismus

d. h. das heißt

DBU 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

DCM Dichlormethan

DIPEA N,N-Diisopropylethylamin oder Hünig-Base

DMF Di-Methylformamid

DNA Desoxyribonukleinsäure

DTNB Dithionitrobenzoessäure - Ellmans Reagenz

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

Et Ethylrest

FAM Carboxyfluorescein

Fmoc 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

HCTU O-(1H-6-Chlorbenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

IPTG Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid

Me Methylrest

NMR Kernspinresonanzspektroskopie

NRPS Nicht Ribosomale Peptidsynthetase



---

p. a.	<i>pro Analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SBTI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNAC	<i>S-N</i> -Acetylcysteamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Trisopropylsilanyl
TLCK	Tosyl-L-Lysinchloromethylketon
TNB	2-Nitro-5-Thiobezoat
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolettstrahlung
vgl.	vergleiche
Vis	sichtbares Licht
Vol.	Volumen
X	Heteroatom, hier N, O oder S
Xaa	Dreibuchstabencode für eine allgemeine Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe