

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

Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XV
Reaktionsschemata	XVII
Nomenklatur	XIX
Teil I	1
1 Einleitung	3
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
2 Zielstellung	19
Teil II	21
3 Theoretischer Teil	23
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
Teil III	43
4 Ergebnisse und Diskussion	45
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
5	Zusammenfassung	95
	Literaturverzeichnis	99
	Anhang	119
A	Material	123
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	Methoden	129
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
C	Anhang	137
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
Index	155
Publikation	159

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- β -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	Trisopropylsilylanyl
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